Tunmann-Rosenthaler

Pflanzenmikrochemie

Zweite Auflage

Pflanzenmikrochemie

von

O. Tunmann

Zweite vermehrte und verbesserte Auflage

von

L. Rosenthaler

Pflanzenmikrochemie

Ein Hilfsbuch
beim
mikrochemischen Studium pflanzlicher Objekte

Dr. O. Tunmann
Privatdozenten an der Universität

Zweite vermehrte und verbesserte
bearbeitet von

Dr. L. Rosenthaler
Professor an der Universität Bern

Mit 190 Abbildungen im Text

Berlin
Verlag von Gebrüder Borntraeger
W 35 Schöneberger Ufer 12a
1931

Aus dem Vorwort zur 1. Auflage

Bei der Abfassung des Buches waren folgende Gesichtspunkte maßgebend.

Die Untersuchungsmethoden sind tunlichst vollständig gebracht. Auch ältere Verfahren sind angeführt, nicht nur dort, wo keine besseren zur Verfügung stehen, sondern zuweilen auch neben den modernen. Hierfür war die Erfahrung maßgebend, daß nicht selten in den sog. „veralteten" Verfahren ein guter Kern steckt, und daß zuweilen kleinere Abänderungen zur Verbesserung genügen. Schließlich ist nicht immer das Neue auch zugleich das Bessere. Bei allen Untersuchungen, die zur Ermittelung der Lokalisation unternommen werden, müssen die Ergebnisse mitgeteilt werden. Diese Notwendigkeit zeigt sich besonders bei den Alkaloiden und Glykosiden, die eine zusammenfassende Darstellung bisher von keiner Seite erfahren haben. Unstimmigkeiten in den Befunden sind hervorgehoben und zur Diskussion gestellt, um eine Nachprüfung anzuregen. Auch die in Kleindruck gestellten Angaben über das Vorkommen und die Verbreitung der Pflanzenstoffe, über die quantitativen Ergebnisse der chemischen Forschung und die zahlreichen Hinweise auf die physiologische Bedeutung der Körper stehen in einem innigen Zusammenhang mit der Mikrochemie. Sie zeigen uns die brauchbarsten Versuchsobjekte, geben uns an, in welchen Pflanzenteilen und zu welcher Jahreszeit wir die besten Resultate erwarten können, und bewahren den Anfänger vor Enttäuschungen, die gar zu oft vor einem weiteren Einarbeiten abschrecken. Für die Aufnahme der physiologischen Hinweise war die Tatsache ausschlaggebend, daß die Pflanzenmikrochemie ein wichtiges Hilfsmittel bei der Erforschung der physiologischen Verhältnisse ist. Vielfach werden mikrochemische Arbeiten zur Klärung physiologischer Fragen unternommen. Das in dieser Hinsicht Mitgeteilte, das die neuere Literatur berücksichtigt, dürfte zur ersten Orientierung genügen. Bei weiteren Studien wird man natürlich zur chemischen und physiologischen Spezialliteratur greifen. Eine ausführliche Bearbeitung hat die Zelle gefunden. Ist doch die genaue Kenntnis der organisierten Zellbestandteile selbst für die angewandte Pflanzenmikrochemie Grundbedingung; anderenfalls können jederzeit Irrtümer unterlaufen, so können, um nur ein Beispiel anzuführen, Zellkerne für Oxalate gedeutet werden und Alkaloidniederschläge vor-

täuschen. Dieser Abschnitt dürfte jedenfalls allen denen willkommen sein, die sich noch nicht eingehender mit der lebenden Zelle beschäftigt haben.

Aus Vorstehendem geht hervor, daß bei der Abhandlung des Gebietes die Grenzen nach jeder Richtung hin weit gesteckt wurden. Auch die Färbungen wurden aufgenommen, da sie zur Diagnose dienen, in bestimmten Fällen übrigens auf chemischen Prozessen beruhen dürften. Das Buch hat dadurch etwas an Umfang zugenommen, wird aber auch eine ausgedehntere Anwendung gestatten, zumal die mikrotechnische Seite eingehende Berücksichtigung fand.

Die Pflanzenmikrochemie steht erst im Anfange ihrer Entwicklung. Überall sind große Lücken vorhanden. Ihr weiterer Ausbau wird und muß erfolgen, nicht etwa, weil gegenwärtig hier und da Neigung zu mikrochemischen Studien besteht, sondern aus zwingenden Gründen, die uns die zunehmende Bedeutung der Pflanzenmikrochemie, besonders der angewandten, erkennen lassen. Nur wenige Hinweise mögen zur Begründung dienen: — Von großer Wichtigkeit sind mikrochemische Arbeiten auf dem Gebiete der systematischen Anatomie, worauf schon vor Jahren von Solereder hingewiesen wurde. Wenn hier die Erfolge der Mikrochemie nicht augenfällig zutage treten, so liegt dies daran, daß eine Zusammenstellung der ermittelten Befunde fehlt, und daß die Anatomen bisher mikrochemische Fragen meist unbeachtet ließen, wahrscheinlich weil die erforderlichen Methoden nicht übersichtlich zur Hand waren. Wo man näher auf die Mikrochemie eingegangen ist, sind in der Mehrzahl der Fälle die Erfolge nicht ausgeblieben. Mannit, Dulcit, Enzymzellen u. a. sind zur Gruppeneinteilung benutzt worden. Zuweilen stellen sich überraschende Resultate heraus. Wurzeln und Rhizome von Gelsemium sempervirens lassen sich mikrochemisch in einer Minute von den ähnlich gebauten Organen von G. elegans unterscheiden. Von den reichen Schätzen, welche die Herbarien der Kulturländer bergen, ist nur ein verschwindend kleiner Bruchteil mikrochemisch untersucht. Wäre auch nur ein Teil der Zeit und Mühe, die die Erforschung des anatomischen Baues beanspruchte, auf die Mikrochemie gefallen, dann wären wir heute über viele Fragen besser unterrichtet, so beispielsweise über die Frage, ob systematisch nahe stehende Pflanzen in ihren chemischen Produkten übereinstimmen und ob die als „Ausnahmen" bekannten Pflanzen nicht doch einen entwicklungsgeschichtlichen Zusammenhang zeigen. Wohl fehlen vielfach makrochemische Angaben. Doch gerade dann kommt der Mikrochemie ein hoher orientierter Wert zu; sie fordert den Chemiker zur Nach- und Weiterprüfung heraus. Bei nicht wenigen Pflanzen müssen wir schon deshalb zur Mikrochemie greifen, weil sie in größerer, zu einer makrochemischen

Untersuchung ausreichenden Menge nicht oder doch nur sehr schwer zu beschaffen sind. Der Ausbau der systematischen Anatomie ist vollendet, eine Ergänzung durch mikrochemische Studien ist erforderlich. Hierbei kommt es hauptsächlich auf den Nachweis bestimmter Körper an (die Lokalisationsermittlung steht erst an zweiter Stelle) und zu derartigen Prüfungen lassen sich fast stets Herbarpflanzen benutzen. — Bei der Untersuchung der Drogenpulver hat sich wiederholt gezeigt, daß eine genaue Bestimmung verschiedener Pulver auf rein anatomischem Wege nicht nur unvollständig, sondern geradezu unmöglich ist. Hierzu kommt, daß nur mikrochemische Reaktionen uns darüber aufklären, ob einem Pulver die wirksamen Bestandteile entzogen sind, und daß in neuerer Zeit vielfach Pulver in den Handel kommen, bei denen die diagnostisch brauchbaren Charaktere durch eine zu weitgehende Zerkleinerung derart zerstört sind, daß die anatomische Untersuchung unmöglich wird. Auch bei unzerkleinerten Drogen führen mikrochemische Reaktionen oft weit schneller, doch ebenso sicher zum Ziele wie makrochemische Untersuchungen. Überdies liegen in den weitaus meisten Fällen die wirksamen Bestandteile in den Zellinhalten und schon aus diesem Grunde sollte das mikrochemische Studium mehr wie bisher Berücksichtigung finden. — Seit langem zieht man die Mikrochemie bei der Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel mit Erfolg heran und auf dem Gebiete der Prüfung von Papieren und Pflanzenfasern kann man ohne sie nicht auskommen. — Eine eingehende mikrochemische Vorprüfung der zu untersuchenden Objekte wird für den Chemiker ebenfalls nur von Vorteil sein; sie wird den zu wählenden Untersuchungsgang bestimmen und während der Untersuchung Aufklärung geben, ob die benutzte Methode zuverlässig ist, ob nicht etwa bei Membranstudien Zellinhalte mit verarbeitet worden sind u. a. Nur zu oft greift der Chemiker erst sehr spät zum Mikroskop, nicht selten nur, um „Kristalle“ zu suchen. — Nicht zu entbehren ist schließlich die Mikrochemie überall dort, wo nur geringe Mengen zur Verfügung stehen, oder das Material aus irgendeinem Grunde geschont werden muß. Wie viele Harze werden nicht untersucht, weil sie nur in kleineren Mengen oder nur in Sammlungsstücken zur Verfügung stehen? Bei seltenen Objekten (Mumienharzen) ist in Zukunft eine aufklärende Voruntersuchung auf mikrochemischem Wege dringend geboten, damit nicht die makrochemische Untersuchung wertvolle, schwer zu beschaffende Objekte restlos verarbeitet und eine Nachprüfung ausschließt. — Auf die Bedeutung der reinen Pflanzenmikrochemie braucht nicht eingegangen zu werden, denn es ist allgemein bekannt, daß sich unser

Wissen über die Zelle zum großen Teile auf mikrochemische Studien aufbaut.

Wir sehen, die Pflanzenmikrochemie ist nicht nur für den Botaniker, Pharmakognosten, Apotheker, Nahrungsmittel- und Phytochemiker, sondern für alle, die sich mit der Untersuchung pflanzlicher Objekte beschäftigen, unentbehrlich.

Bern, Anfang Dezember 1912 **O. Tunmann**

Vorwort zur 2. Auflage

Von dem Verleger der schon längst vergriffenen Tunmannschen Pflanzenmikrochemie aufgefordert, die zweite Auflage zu besorgen, habe ich diese Aufgabe unternommen. Nicht gerade leichten Herzens. Ist es schon an sich schwer, das Werk eines andern fortzuführen — si duo faciunt idem, non est idem —, so gilt dies besonders für ein Werk von Tunmann, der als bedeutendster Pharmakognost seiner Zeit eine Fülle von Fähigkeiten und Kenntnissen in sich vereinigte, die sich in keinem andern so leicht mehr zusammenfinden werden. Doch habe ich mich bemüht, das Werk auf der ihm von Tunmann gegebenen Höhe zu halten, indem ich die notwendig gewordenen Berichtigungen und Ergänzungen anbrachte. Neu hinzugekommen sind u. a. die Abschnitte: Der Mikromanipulator, Allgemeines über Färbungen, Aschenpräparate, Verkohlungspräparate, Azetaldehyd, Flüchtige Amine, Harnstoff, Primin, Anthranolglykoside, Hesperidinähnliche Stoffe, Verbindungen von Uronsäuren, Lebendfärbung, Membranfarbstoffe der Moose, Farbstoffe der Pilze und Bakterien, Amyloid, Furfuroide Membranstoffe, Sporenpollenine, Mikrochemisches über Hefe, Zur Mikrochemie der Bakterien u. a. m.

Auch die Zahl der Abbildungen wurde vermehrt.

Die Aufgabe der Neubearbeitung wurde mir dadurch erleichtert, daß der als vorzüglicher Techniker bekannte Berner Privatdozent Dr. G. von Büren den Abschnitt „Mikrotomtechnik" bearbeitete und mich auch bei der Bearbeitung der Abschnitte „Dauerpräparate und ihre Anfertigung" und „Der Zellkern" mit seinem Rat unterstützte.

Die Durchsicht und Überarbeitung der Abschnitte „Optisches" und „Zählen und Messen" verdanke ich Herrn Dr. Ehlers (Jena), der außerdem auch die Ausführungen über den Mikromanipulator beigesteuert hat. Der Mikromanipulator ist für die Mikrochemie offenbar deshalb von Bedeutung, weil die Ermittlung der Lokalisation der Pflanzenstoffe um so genauer sein wird, je geringer die Zahl der anatomischen Elemente ist, die in den zu den Reaktionen verwendeten Präparaten vorhanden sind.

Bern, im April 1931 **Rosenthaler**

Inhaltsübersicht

Einleitung

„Die Pflanzenzelle als Organismus läßt sich auch in isoliertem Zustand nicht ausschließlich vom chemischen oder ausschließlich vom physikalischen Standpunkt aus erfassen. Morphologie, biologische Funktion, chemische Substanz und physikalisches Verhalten stehen in Beziehung zueinander und müssen als Ganzes gesehen werden.“ Max Lüdtke,
Annal. Chem. 1928, Bd. 466, S. 48.

Die Pflanzenmikrochemie ist diejenige Disziplin, die sich mit der Anwendung qualitativer mikrochemischer Verfahren auf pflanzliche Gegenstände befaßt[1]). Die mit dieser Definition gegebene Abgrenzung unseres Gebiets hängt in letzter Linie davon ab, was man unter mikrochemischen Verfahren verstehen will und erfordert eine Entscheidung darüber, wo die Grenze zwischen Mikro- und Makroverfahren zu ziehen ist und was man als ein chemisches Verfahren bezeichnen will. In letzterer Hinsicht macht bei der immer enger werdenden Verflechtung von Chemie und Physik eine scharfe Abgrenzung von physikalischen und chemischen Verfahren und Gesichtspunkten Schwierigkeiten[2]), in ersterer ist bekanntermaßen die Abgrenzung des Mikro- vom Makrogebiet willkürlich. Man kann mit Feigl jedes schnell durchführbare Verfahren und jede Reaktion als mikrochemisch bezeichnen, die den Nachweis von Mengen bis höchstens 10 μg=10 γ=$^1/_{100}$ mg[3]) gestattet. In der Pflanzenmikrochemie ist dann noch die Einschränkung zu machen, daß der

[1]) Über die Abgrenzung der Pflanzenmikrochemie s. auch J. Kisser, Die Bedeutung der Methoden der botanischen Mikrotechnik für die pflanzliche Mikrochemie und Histochemie, Pregl-Festschrift 1929, S. 178.

[2]) „Diffusion und Osmose, Adsorptionserscheinungen, Quellung, Oberflächenspannung, Viskosität, Elastizität, Adhäsion und Kohäsion, elektrostatische Ladungen und ihre Verteilung gehen auch die Mikrochemie an“ (J. Gicklhorn, Mikrochemie und Mikrophysik, Protoplasma 1926/1927, I.)

[3]) 1 Mikrogramm = $^1/_{1000}$ mg = 1 γ oder 1 μg; 1 Mikromilligramm = $1/_{1000000}$ mg = 1 $\mu\gamma$ oder 1 μmg.

Nachweis mikrochemisch erfaßbarer Stoffmengen mit kleinen Mengen von pflanzlichem Material vorgenommen werden soll. Die Begrenzung des letzteren nach oben ist dadurch gegeben, daß die pflanzenmikrochemischen Verfahren in der Regel auf einem Objektträger ausgeführt werden.

Man kann mit Tunmann reine und angewandte Pflanzenmikrochemie unterscheiden: „Das vornehmste Ziel der reinen Pflanzenmikrochemie liegt in dem Nachweis der Körper in der Zelle selbst und im Gewebe, sowie in der eingehenden Charakteristik der Zellwände und der organisierten Bestandteile der Zelle. Hauptaufgabe der angewandten Pflanzenmikrochemie ist der tunlichst unmittelbar mit den pflanzlichen Objekten am Objektträger ausgeführte Nachweis der Pflanzenstoffe bei möglichst geringem Aufwand an Zeit und Material". Mir scheint es logischer, die Worte rein und angewandt in der Pflanzenmikrochemie ebenso zu gebrauchen, wie in anderen Wissenschaften. Ich verstehe also unter reiner Pflanzenmikrochemie denjenigen Zweig, der die Mikrochemie der Pflanzen nur um ihrer selbst zu beschreibenden Zwecken treibt — man könnte sie deswegen auch deskriptive Mikrochemie nennen —, während angewandte Pflanzenmikrochemie dann vorliegt, wenn mit der Mikrochemie irgendein bestimmter Zweck in wissenschaftlicher oder praktischer Hinsicht verfolgt wird.

Zu der reinen Pflanzenmikrochemie gehört u. a. das, was man auch als pflanzliche Histochemie (Molisch, Klein) bezeichnet hat, die Beschreibung der Lokalisation der Pflanzenstoffe. Man kann mit Kisser unterscheiden: 1. die Gewebslokalisierung, 2. die Zelllokalisierung, 3. die absolute Lokalisierung, d. h. den Nachweis der Stelle, in der die Stoffe innerhalb der Zelle lokalisiert sind.

Hier erhebt sich sofort die Frage, wie weit ein solcher Nachweis mit den heutigen Hilfsmitteln der Pflanzenmikrochemie durchgeführt werden kann. Die notwendigen Voraussetzungen für einen mikrochemischen Nachweis sind nach Brunswik: 1. seine Eindeutigkeit, 2. die Erfassungsgrenze, 3. die Lokalisation.

1. Die Eindeutigkeit läßt bei vielen der in der Pflanzenmikrochemie angewandten Reaktionen zu wünschen übrig. Es mag daran erinnert werden, daß sehr zahlreiche Färbungen, die zum Nachweis von Fetten angewandt werden, lediglich auf der Adsorption von Farbstoffen durch in Wasser nicht lösliche Stoffe beruhen. Bei den Kristallfällungen ist die Isomorphie zu berücksichtigen, z. B. die zwischen vielen Verbindungen des Kaliums und Ammoniums. Auch ist zu bedenken, daß die Form der Kristalle durch Fremdstoffe verändert werden kann. Andererseits verhindern Fremdstoffe häufig die Reaktionen, sowohl Farb- als Kristallreaktionen, so daß man auch aus dem verneinen-

den Ausfall einer Reaktion nicht immer auf das Fehlen des gesuchten Stoffes schließen darf.

2. Es empfiehlt sich, auch in der pflanzlichen Mikrochemie die scharfen Definitionen zu benützen, die Feigl[1]) eingeführt hat.

Erfassungsgrenze ist die kleinste absolute Menge Substanz, die durch irgendeine Reaktion oder Methode noch nachweisbar und bestimmbar ist.

Empfindlichkeitsgrenze — neuerdings nach dem Vorschlag von Hahn, Grenzkonzentration — drückt das Verdünnungsverhältnis in einem Lösungsmittel aus, in dem gerade der Nachweis noch möglich ist.

Grenzverhältnis ist die Zahl, die angibt, neben wieviel Teilen eines Begleitstoffes mit oder ohne vorhergegangene Trennung ein Teil des zu suchenden Stoffs noch aufgefunden werden kann.

Die Erfassungsgrenze läßt sich steigern, wenn sich die Reaktion an einem festen Stoff durchführen läßt. Deshalb gehören zu den empfindlichsten mikrochemischen Reaktionen (Erfassungsgrenze bis $10^{-6}\ \gamma$) der Nachweis der Stärke, des Glykogens, Lignins (mit Phlorogluzin-Salzsäure), des Fetts (mit Sudan III oder Osmiumsäure), des Suberins, der Zellulose, des Chitins u. dgl. Die hohe Empfindlichkeit, die diejenige der gewöhnlichen Ionenreaktionen durchschnittlich um vier Zehnerpotenzen übersteigt, kommt dadurch zustande, daß es sich „nicht um rein chemische Umsetzungen handelt, sondern daß physikalische Faktoren mitspielen (Eingehen des Jods in eine „feste Lösung“, Adsorption, Farbstoffspeicherung usw., Brunswik[2])).

Gicklhorn[3]) hat ferner darauf aufmerksam gemacht, daß allgemein die Empfindlichkeit von Reaktionen in strukturierten Organismen größer sein kann, als in homogenen Medien, wenn sich im Reaktionsraum Stellen mit bevorzugter Angriffsrichtung finden. „Solche gerichtete lokale Reaktionen sind möglich auf Grund der großen untereinander verschiedenen Oberflächen in strukturierten Medien.“

Andererseits ist nach Gicklhorn zu beachten, daß die geometrische Gestalt der Reaktionsfelder und ihrer Grenzflächen von wesentlicher Bedeutung ist. „Denn unter bestimmten Bedingungen zeigt sich, daß Ecken und Kanten, spitze Ausläufer oder Buchten frei von Niederschlägen bleiben, auch wenn sie ausreichende Stoffmengen für eine sicht-

[1]) F. Feigl, Mikrochemie 1923, I, S. 4; F. L. Hahn, ebenda 1930, VIII, S. 75.

[2]) H. Brunswik, Die Grenzen der mikrochemischen Methodik in der Biologie, Die Naturwissenschaften 1923, XI, S. 881.

[3]) J. Gicklhorn, Über die Entstehung und die Formen lokalisierter Manganspeicherung bei Wasserpflanzen. Protoplasma 1926/27, I, S. 372.

bare Reaktion führen — bestimmte Erscheinungen oder bestimmte Formen der Reaktionsprodukte treten überhaupt erst bei bestimmter Größendimension der Reaktionsfelder auf.“ Aus allen diesen Gründen ergibt sich, daß die Grenzen der biologischen Methodik, wie sie von Brunswik[1]) und Mayrhofer[2]) auf Grund der für homogene Medien bekannten Tatsachen errechnet wurden, nicht ohne weiteres auch für strukturierte Medien gelten.

3. Bei der Beurteilung der Frage, ob der Ort einer beobachteten Fällung auch der Ort der ursprünglichen Lokalisation ist, ist Vorsicht geboten. Wie Liesegang[3]) gezeigt hat, gelingt es nämlich nicht, das in irgendeiner Gallerte gleichmäßig verteilte Salz durch eine eindringende zweite Lösung so zu fällen, daß der Niederschlag ebenfalls gleichmäßig verteilt ist. Der Ort der Fällung wird in diesem Fall in erster Linie dadurch bestimmt, wie rasch die Stoffe in die Gallerte zu diffundieren vermögen. Diffundiert das Reagens langsam oder gar nicht, so wenn es als Kolloid vorliegt, der in der Gallerte befindliche Stoffe aber rasch, so wird im letzteren Fall die Reaktion außerhalb der Gallerte, im ersteren in ihrer äußeren Zone verlaufen.

Nach Patschovsky[4]) ist der Ort der Abscheidung in kolloiden Medien abhängig von dem Konzentrationsverhältnis der aufeinander wirkenden Stoffe. Nur, wenn das Reagens den höheren osmotischen Druck habe, werde die Lokalisation richtig angezeigt.

Der größte Teil der Schwierigkeiten des Lokalisationsnachweises wird sich überwinden lassen, wenn es gelingt, mit Hilfe des Péterfi-Siedentopfschen Mikromanipulators sehr kleine Gewebeteile, wenn möglich, einzelne Zellen zu den mikrochemischen Reaktionen heranzuziehen[5]).

Eine viel erörterte und doch nicht immer genügend beachtete Schwierigkeit liegt darin, daß es oft sehr schwer, wenn nicht unmöglich ist, zu entscheiden, ob Gebilde, wie Membranen und Strukturen irgendwelcher Art, die man nach der Einwirkung mikrochemischer R

[1]) Brunswik l. c.

[2]) A. Mayrhofer, Mikrochemie der Arzneimittel und Gifte (Berlin u. Wien 1928), S. 2ff.; Die Anwendungsmöglichkeiten qualitativer mikrochemischer Reaktionen bei der Untersuchung tierischer Organe, Mikrochemie 1925, III, S. 68.

[3]) R. E. Liesegang, Exogene Fällungen bei der histologischen Färbung. Zeitschr. wiss. Mikrosk. 1914, XXXI, S. 466.

[4]) N. Patschovsky, Über Nachweis, Lokalisierung und Verbreitung der Oxalsäure (gelösten Oxalate) im Pflanzenorganismus. Ber. deutsch. bot. Ges. 1918, XXXVI, S. 542.

[5]) T. Péterfi, Das mikrurgische Verfahren, Die Naturwissenschaften 1923, XI, S. 81.

besonders der Fixierungsmittel beobachtet, Kunstprodukte sind oder nicht.

Werner[1]) äußert sich über diese Fragen folgendermaßen:

1. Es ist bei der Fixation unmöglich, den intervitalen, natürlichen Zustand unverändert zu erhalten. 2. Man kann bei der Fixation Kunstprodukte absichtlich hervorbringen (Fixationsexperiment), um über bestimmte Eigenschaften bestimmter Gebilde Aufschluß zu erhalten. 3. Auch jedes beliebige Kunstprodukt hat Erkenntniswert, weil es eine von den vielen möglichen Reaktionen eines Gebildes darstellt. 4. Kunstprodukte sind zu Schlüssen auf die natürliche Beschaffenheit nur mit allergrößter Vorsicht zu benutzen. Man muß dabei die „normalen“ Befunde vergleichen und berücksichtigen, wie weit die Entstehung des Artefakts möglich und wahrscheinlich ist.

Membranartige Strukturen sind nach Yamaha[2]) nichts anderes als die merklich hervortretenden Phasengrenzen zwischen einzelnen Strukturelementen, welche aller Wahrscheinlichkeit nach durch den Phasenumschlag der angeblichen emulsoiden Strukturen des Protoplasmas gebildet werden. Zu ihnen sind zu rechnen: die Hautschicht, die Kernwand, die Außenhülle der Chromosomen, filzige, streifige und membranöse Struktur des Zytoplasmas, Bläschenkörper im Zytoplasma, fädige Struktur der Spindelsubstanz.

Brunswik kam aus seinen Berechnungen und Überlegungen zu dem Schluß, daß die biologische oder Zellmikrochemie infolge zu geringer Empfindlichkeit und zu wenig „subtiler“ Lokalisation bei der Lösung der Stoffwechselprobleme und der Formwechselfragen nicht entscheidend mitwirken können, daß Versuche in dieser Richtung aus theoretisch errechenbaren Gründen zu völligem Mißerfolge führen müssen, und daß ein Fortschritt auf diesem Gebiete nicht zu erwarten sei. Demgegenüber ist darauf hinzuweisen, daß die Erfassungsgrenze eines Stoffes noch beträchtlich hinausgeschoben werden kann, wenn er katalytische Eigenschaften zu äußern vermag, wie dies bei manchen Eisenverbindungen der Fall ist oder wenn er in irgendeine Form übergeführt werden kann, die dann als Keim zur Bildung sichtbarer Aggregate dienen kann, ein Prinzip, das von Bechhold zur Sichtbarmachung subvisibler Gebilde angewandt worden ist.

[1]) C. F. Werner, Über Wert und Beweiskraft von Kunstprodukten bei der Fixation, Zeitschr. wiss. Mikr. 1927, XLIV, S. 435.

[2]) G. Yamaha, Experimentelle zytologische Beiträge. 1. Mitteilg. Orientierungsversuche an den Wurzelspitzen einiger Pflanzen; Derselbe, 3. Mitteilg. Über die Wirkung einiger Chemikalien auf die Pollenmutterzellen von Daphne odora Thunb. Ref. in Zeitschr. wiss. Mikr. 1927, XLIV, S. 383.

Zum Schlusse möge aber dann doch auch vor einer Überschätzung der Pflanzenmikrochemie gewarnt werden. Grenzen sind ihr einerseits dadurch gezogen, daß ihre Methoden und Ergebnisse in weitgehendem Maße von Feststellungen abhängig sind, die außerhalb der Pflanze, sei es auf makro- oder mikrochemischem Wege vorgenommen werden müssen, andererseits dadurch, daß durch viele Methoden der Pflanzenmikrochemie bestimmte Stoffe — man denke etwa an den Nachweis von Membranstoffen — nicht mit Sicherheit identifiziert werden können. Innerhalb dieses Rahmens kann aber die Pflanzenmikrochemie ohne Zweifel viel nützliche Arbeit leisten.

A. Allgemeiner Teil

Das Untersuchungsmaterial

Zu mikrochemischen Studien läßt sich nicht nur lebendes und in geeigneter Weise lebend fixiertes und gehärtetes Material, sondern in vielen Fällen auch konserviertes (Alkohol, Formaldehyd), sowie getrocknetes (Drogen- und Herbarmaterial) verwenden. Überall dort, wo es sich um den Nachweis von Stoffen handelt, die im Zellsaft gelöst sind (und das sind die meisten mit Ausnahme der organisierten Zellbestandteile), ist lebendes Material vorzuziehen, sehr oft unbedingt notwendig. Im allgemeinen wird der Mikrochemiker in seinen Objekten und Präparaten auf größere Mengen an reagierenden Substanzen rechnen können, als es nach den quantitativen Befunden der Chemie den Anschein hat, denn die chemische Isolierung der meisten Pflanzenstoffe ist mit großen Verlusten verbunden. Hier ist ein Vorteil gegeben, der jedoch durch verschiedene Umstände sehr eingeschränkt wird.

Selbst **lebendes Material** verlangt Beachtung verschiedener Faktoren. Es ist wohl selbstverständlich, daß das Vegetationsstadium der Pflanzen und das Alter der untersuchten Organe zu berücksichtigen ist[1]) und daß die Literaturangaben, falls nicht ausdrücklich etwas anderes vermerkt ist, sich nur auf gesunde Pflanzen und Pflanzenteile beziehen. Glykoside sind in ausdauernden Gewächsen häufig vor dem Austreiben der Knospen in größeren Mengen gespeichert, während der Vegetation erfolgt zuweilen eine Zunahme (Syringin), in anderen Fällen nicht (Hesperidin). Sie können in lebenden Pflanzen durch Pilze zersetzt werden (Convallaria majalis, Prunus laurocerasus) und in etiolierten Blättern geschwunden sein (Prunus laurocerasus). Die Tageszeit der Einsammlung kann ebenfalls die Untersuchung beeinflussen. In der Nacht findet bei den von Weevers untersuchten Glykosiden eine Abwanderung des glykosidischen Zuckers statt, am frühen Morgen trifft man in den Blättern nur das Aglykon an. Wenn wir nur letzteres nach-

[1]) Die Blätter von Prunus laurocerasus enthalten um so mehr Prozente Blausäure, je jünger sie sind.

weisen, so wird die Abwanderung im allgemeinen nicht störend falls nicht, was ebenfalls eintritt, eine weitere Veränderung des Aglykons erfolgt. Außerdem weisen viele Pflanzenstoffe eine weitgehende Variation auf[1]). Alle diese Verhältnisse treten bei makrochemischen Arbeiten, bei denen bei der Verarbeitung vieler Pflanzen Durchschnittswerte erzielt werden, weniger in Erscheinung, sind bei der mikrochemischen Untersuchung jedoch von großem Einfluß. Hier hat die Mikrochemie noch ein weites unbebautes Feld. Häufig stellt man Pflanzen, um sie frisch zu halten, in Wasser. Bei längerem Stehen in Wasser können die Objekte weitgehende Veränderungen im Chemismus erleiden. Reservestoffe (Zucker, Stärke, Glykoside u. a.) können aufgebraucht werden; andere Körper (Colchicin) erfahren Zersetzungen und sind dann nicht mehr nachweisbar. Auch bei der Aufbewahrung in der feuchten Kammer können manche Stoffe verschwinden. Anormale Bodenverhältnisse und abnorme Witterung werden sich ebenfalls bei dem Untersuchungsmaterial bemerkbar machen.

Lebend **fixiertes** und **gehärtetes** Material ist bei Zellkernstudien unentbehrlich, ebenso bei leicht löslichen Schleimen, Gallerten und gummösen Flüssigkeiten; es wird auch zur Untersuchung von Plasma und Chromoplasten benutzt. Die Art der Fixierung richtet sich nach der beabsichtigten Untersuchung. Zur Härtung dient in erster Linie Weingeist, bei Schleimen Bleiazetat und Kupferazetat (s. Schleim). Vorzugsweise wird fixiertes Material zu Färbungen genommen. Die Fixierung soll möglichst die Strukturverhältnisse des lebenden Zustandes erhalten. Vielfach entstehen hierbei Kunstprodukte, so daß ein Vergleich mit lebendem Material unerläßlich ist (vgl. S. 4 u. 5). Näheres über Fixierung und Härtung siehe unter Zellkern.

Konserviertes Material: Die Art der Konservierung muß sich ebenfalls nach der vorzunehmenden Untersuchung richten. Zum Konservieren dient gewöhnlich Weingeist, weniger Formaldehyd, Pikrinsäurealkohol u. a. (s. Zellkern). W e i n g e i s t m a t e r i a l ist nur zum Teil mit fixiertem identisch, da man zur Aufbewahrung in der Regel nur 70proz. Weingeist nimmt, der zudem durch Verdunstung (wiederholtes Öffnen des Präparatenglases) und durch das in den Pflanzen enthaltene Wasser noch schwächer wird. Überdies dringt der Weingeist in Pflanzen und größere Pflanzenteile nicht genügend rasch ein, so daß die Härtung (und Fixierung) gewöhnlich unvollkommen ist. Absoluter Alkohol wird selten benutzt. Er ist zu teuer und ruft zu starke Schrumpfungen hervor.

[1]) Über Variation der Pflanzenstoffe s. u. a. L. Rosenthaler, Biochem. Zeitschr. 1923, CXXXVI, S. 482, Ber. d. deutsch. pharmaz. Ges. 1919 und folgende Jahrgänge.

Weingeistlösliche Substanzen fehlen naturgemäß, scheiden sich bisweilen beim Trocknen des Weingeistmaterials an seiner Oberfläche aus (Kristalle von Hydrastin, Vanillin, Alantsäureanhydrid u. a.). Da viele Enzyme durch kalten Weingeist, wie er zum Einlegen benutzt wird, nicht abgetötet werden, so finden im Weingeistmaterial vielfach Spaltungen statt. Andererseits gelangen wasserlösliche Stoffe (Inulin, Phosphate und andere anorganische Salze) zur Abscheidung. Chlorophyllfarbstoff und andere Farbstoffe werden ausgezogen, die Pflanzen werden mehr oder weniger gebleicht, zuweilen aber auch gebräunt und geschwärzt. Letztere Färbung erscheint selbst beim Einlegen in völlig absoluten Alkohol. In diesen Fällen ist der Alkohol ebenfalls zu langsam eingedrungen und hat die Farbstoff abspaltenden Enzyme nicht sofort abgetötet (Nekrobiose)[1]. Ein Eintragen der Pflanzen, sofort nach dem Abpflücken, in siedendes Wasser oder in siedenden Weingeist bringt Abhilfe. Darauf werden die Pflanzen in gewöhnlichen Weingeist gebracht. Eine stärkere Nachfärbung ist nicht mehr zu befürchten. Diese „Kochmethode" ist von Heinricher[2]) bei chlorophyllfreien phanerogamen Parasiten und Saprophyten benutzt worden. — Gerbstoffhaltige Zellen fallen in Weingeistmaterial häufig durch ihre Färbung sofort auf. — Ziemlich weitgehend sind die Veränderungen, welche die Schleimmembranen und die Aleuronkörner in Weingeist erfahren.

Die Nachteile, die ein Schnitt bei der Übertragung von Weingeist in Wasser erleiden kann, können vermieden werden, wenn man die Oberflächenspannung des Wassers durch Seife, Saponin u. dgl. vermindert[3].

Sublimat- oder Phenolweingeist leistet im allgemeinen keine besseren Dienste als Weingeist allein.

Recht empfehlenswert ist Weingeistdampf. Auf den Boden eines luftdicht schließenden Gefäßes kommt etwas absoluter Alkohol oder ein mit Alkohol getränkter Wattebausch. Das Material wird an einem Faden am Deckel aufgehängt, ohne daß es mit dem Alkohol in Berührung kommt. — Weingeistmaterial wird leicht brüchig; es wird durch 1- bis 2stündiges Behandeln mit Glyzerinwasser wieder geschmeidig und schneidbar.

[1]) Bei Nekrobiose stirbt das Protoplasma ab, die Enzyme bleiben erhalten und in Tätigkeit (Beijerinck).

[2]) E. Heinricher, *Über das Konservieren von chlorophyllfreien, phanerogamen Parasiten und Saprophyten*, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1892, IX, S. 321.

[3]) H. W. Knipping, Ausschaltung von absteigenden Alkoholreihen durch Verminderung der Oberflächenspannung von Wasser. Zeitschr. wiss. Mikroskop., 1922, XXXIX, S. 204.

Formaldehyd (Formol[1]) gebraucht man, wenn man die Schrumpfungen und Entfärbungen umgehen will, die das Material in Weingeist erleidet. 40proz. Formaldehyd (die Handelsware) wird mit dem 2—3-fachen Volumen destillierten Wassers verdünnt. Die Flüssigkeit braucht nur den unteren Teil des Gefäßes zu erfüllen. Die Gefäße müssen luftdicht verschlossen sein. Stärkere Lösungen härten und sollen nach Penzig[2]) auch bei Ganzmaterial das Protoplasma fixieren, ohne es zu koagulieren (?). Im allgemeinen bleiben die Farbstoffe erhalten, selbst Blütenfarben, doch werden Pflanzen mit hohem Gerbstoffgehalt bräunlich. Es läßt sich ferner Formoldampf verwenden. Bruns[3]) benutzte bei Florideen eine 1proz. Formollösung, doch müssen die Algen vor Licht geschützt werden, um ihre Farbe zu behalten, „wenige Tage Belichtung genügen aber meist, um sie mißfarbig zu machen. Von einer Fixierung des Inhalts durch Formalin kann natürlich keine Rede sein." Gleiche Erfolge sollen mit Kampfer versetztes Meerwasser oder eine konzentrierte Lösung von Chlornatrium in Meerwasser liefern. Für Plankton dienen Mischungen von Methanol, Holzessig, Formalin u. a. Setchell und Osterhout[4]) benutzten bei Cyanophyceen 1proz. Formaldehydlösung, die mit 1proz. Chromalaun versetzt ist, bei Phaeophyceen 1—2proz. Formaldehydlösung in Seewasser; bei Rodophyceen erhält 1proz. Chromalaunlösung am besten die Farbe. Bei quellbaren Algen (Polysiphonia) ist Formolseewasser (1 Formol : 20,0, eine Stunde) zu empfehlen, „danach Abspülen in Seewasser und Übertragen in Alkohol + Seewasser 1 : 9" (Tobler)[5]). Zum Konservieren von Chlorophyceen, vorzüglich ihrer Chloroplasten, wird die Ripartsche[6]) Flüssigkeit benutzt (nach Tempère: Kupferchlorid, Kupfernitrat je 0.2 g, Phenol 1 g,

[1]) Formaldehyd wurde zur Härtung und Konservierung tierischer Gewebe von F. Blum empfohlen: Das Formaldehyd als Härtungsmittel, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1893, X, S. 314 und: Notiz über die Anwendung des Formaldehyds als Härtungs- und Konservierungsmittel, Anatom. Anzeiger, 1893, IX.

[2]) O. Penzig, Das Formalin als Konservierungsflüssigkeit für pflanzliche Präparate, Malpighia 1894 und Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1895, XII, S. 115; L. Linsbauer, Über einige Versuche über die konservierende Wirkung von Formol, Bot. Centralbl., 1894, LX, S. 364.

[3]) E. Bruns, Beitrag zur Anatomie einiger Florideen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1894, XII, S. 178.

[4]) W. A. Setchell und W. J. V. Osterhout, Some aqueous media for preserving algae for class material, Bot. Gazette, 1896, XXI, S. 140.

[5]) F. Tobler, Fehlergröße einiger Fixierungsmethoden und Quellung einer Algenmembran, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 51.

[6]) Behrens-Küster, Mikr. Tabellen, 1908, S. 79.

Wasser 99 ccm, Eisessig 1 ccm). — Chalon[1]) hält eine Lösung von 3 % Borsäure und 1—5 % Natriumsulfat für morphologische Sammlungen als geeignet. — Auch Schwefeldioxyd in wässeriger Lösung[2]) wurde empfohlen und soll sich besonders bei Pilzen bewähren. Die Objekte entfärben sich (die gelbe Farbe hält sich am besten), bleiben aber elastisch. In vielen Fällen wird sich eine konzentrierte weingeistige Lösung von Pikrinsäure eignen, besonders bei Schleimen höherer Pflanzen, nach Gomont[3]) auch (mit etwas Glyzerinzusatz) bei grünen Süßwasseralgen. Osmiumsäure wird bei pflanzlichen Objekten weniger benutzt.

Getrocknetes Material, auf das man oft ausschließlich angewiesen ist, wird in vielen Fällen, wenn man vom Plasma, Kern und Chromoplasten absieht, gleich gute Dienste wie konserviertes leisten. Von Einfluß auf manche Inhaltsstoffe ist die Art des Trockenprozesses. Verläuft dieser langsam, so finden tiefgreifende Spaltungen statt. Bei schnellem, scharfem Trocknen lassen sich enzymatische Prozesse zum großen Teile ausschalten. Jahrelanges Lagern von Drogen und Herbarpflanzen, vornehmlich bei schlechter Aufbewahrung, kann natürlich weitere Zersetzungen bedingen. Im Zellsaft gelöste Substanzen imprägnieren die organisierten Bestandteile der Zelle, dringen auch in die Membranen ein. Vorzüglich aus Sekretbehältern verdunsten leicht flüchtige Bestandteile teils völlig und sind dann nicht mehr nachweisbar, teils gelangen sie an sekundäre Lagerstätten und zur Kristallisation (Alantsäureanhydrid, Santonin, Kampfer). Sehr viele Substanzen kristallisieren in der Zelle bei Wasserentzug aus (Inulin, Zucker, Hesperidin, Farbstoffe u. a.). Zuweilen wird ein Aufbewahren der lufttrockenen Objekte über Chlorkalzium anzuraten sein. Behalten doch selbst Pollenkörner bei sachgemäßer Aufbewahrung über Chlorkalzium ihre Keimfähigkeit (s. Chemotropismus).

Zum Aufweichen getrockneter Algen und Pilze bedient man sich der Milchsäure. Die Objekte werden in Wasser aufgeweicht, dann in konzentrierte Milchsäure gebracht und auf dem Objektträger erhitzt, bis keine Gasbläschen mehr hervortreten[4]). Das Verfahren ist auch für Drogen neben der Behandlung von Kalilauge, Chloralhydrat u. a. zu empfehlen.

[1]) J. Chalon, Liquides conservateurs pour échantillons botaniques en bocaux, Bull. Soc. Bot. de Belgique, XXXVI, S. 39.

[2]) G. Pollacci, Schwefeldioxyd als Konservierungsmittel für Pflanzen, Atti dell' Ist. Bot. dell' Univ. di Pavia, 1900, 2 Ser. VI, S. 165.

[3]) H. Gomont, Conseils aux voyageurs pour la préparation des algues, Journ. de Bot., 1906, XX, S. 18.

[4]) G. Lagerheim, Über die Anwendung von Milchsäure bei der Untersuchung von trockenen Algen, Hedwigia 1888, S. 58 und: L'acide lactique, excellent agent pour l'étude des champignons secs, Rev. mycolog., 1889, XI, S. 95.

Beim **Versand** von lebendem Material zu mikrochemischen Studien ist auf die Verpackung zu achten, denn für die Enzyme sind günstige Bedingungen auf dem Transporte gegeben, zumal, wenn dieser längere Zeit dauert. Allgemein gültige Vorschriften für die Verpackung lassen sich nicht geben, da viel von dem Zustand der Pflanzen und von der Dauer des Transportes abhängt. Alkaloidpflanzen, die gleich nach der Ernte trocken in Spankörbchen verpackt und verschickt wurden, haben sich bei Postversand nach eigenen Erfahrungen einige Tage gut gehalten. Die Pflanzen müssen jedoch lose (nicht gepreßt) im Körbchen liegen, so daß die Luft allseitig Zutritt hat; auch darf ihnen äußerlich kein Wasser anhaften. Seit einiger Zeit kommt bei Tropenmaterial der Versand in Torfmull[1]) in Blechdosen unter Luft- und Lichtabschluß in Aufnahme, der sich bei Kola[2]) und Ananasfrüchten bewährte und auch für andere Samen und Früchte zweckmäßig sein wird. Seit langem verschickt man Pflanzen in zugelöteten Blechbüchsen (für derbere Objekte recht geeignet). Enzymatische Spaltungen sind naturgemäß nicht ausgeschlossen und wiederholt beobachtet worden (Vanillingeruch bei ganz jungen, nicht fermentierten Früchten von Vanilla) Will man enzymatische Spaltungen vermeiden, so läßt man die Gegenstände in heißes Glyzerin eintragen und verschickt sie in diesem. Für Samen die ihre Keimkraft leicht einbüßen, hat sich gepulverte Holzkohle als geeignetes Verpackungsmaterial erwiesen (Erythroxylon coca)[3]).

Einiges über die Präparation

Die zu mikrochemischen Reaktionen erforderlichen Schnitte werden überwiegend mit freier Hand geschnitten. Die Technik des Schneidens muß hier als bekannt vorausgesetzt werden. Objekte, die sich nicht gut in der Hand halten lassen, werden zwischen Hollundermark oder wenn sie derb sind, zwischen Kork eingeklemmt. Hierbei bekommt gleichzeitig das in freier Hand gehaltene Messer eine bessere Stütze.

Getrocknetes Material läßt sich ohne weiteres ganz gut schneiden, jedenfalls besser, als vielfach angenommen wird. Von einem Aufweichen in Wasser (oder besser in Glyzerinwasser) und von der oft empfohlenen Vorbehandlung mit verdünnter Ammoniaklösung oder schwacher Kali-

[1]) L. Bernegau, Über Verschiffung und Frischhaltung tropischer Früchte in Torfmullpackung, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1911, XXI, S. 162.

[2]) Auf diese Weise versandte Keimlinge keimten und konnten nach einem Jahre im Topf ausgepflanzt werden.

[3]) Es hängt viel von dem Entwicklungsstadium der Samen ab; Kokafrüchte, die nach allgemeiner Ansicht nur 14 Tage ihre Keimkraft behalten, kamen, aus Saigon im Papierbeutel als Warenmuster bezogen, im Botanischen Garten in Bern zur Entwicklung.

lauge kann meist abgesehen werden. Diese Vorbehandlung kommt mehr für feinere anatomische Untersuchungen und auch dann nur für Studien der Vegetationsspitzen und der Reproduktionsorgane in Betracht. Einmal werden bei der Vorbehandlung die Zellinhalte verändert, und Schleime u. a. gelöst und dann liefert zwischen Kork eingeklemmtes trockenes Material sogar dünnere Schnitte als lebendes oder erweichtes. Getrocknetes Material kann auch mit dem Mikrotom (s. d.) geschnitten werden. Liegen sehr spröde Objekte vor, dann ist es ratsam, diese über Nacht in eine feuchte Kammer zu bringen, indem man in einfacher Weise auf einen tiefen mit Wasser gefüllten Teller eine trockene, die Objekte enthaltende Schale stellt und das Ganze mit einer Glasglocke bedeckt[1]).

Handelt es sich um den Nachweis eines Stoffes in den Zellen selbst und um seine Verteilung im Gewebe (Lokalisation), so müssen wir selbstredend die Reaktionen mit den unversehrten Zellen ausführen. Bei zarten Objekten (einzelligen Organismen, Pollen, Zellfäden und -flächen), die durch das Deckglas leicht zerdrückt werden können, bringt man auf dem Objektträger 4 Stützfüßchen für das Deckglas aus Wachs (3 Teile Wachs, 1 Teil Terpentin), Plastin oder erwärmter Kakaobutter an. Praktisch sind auch 2 Stützleisten an den Längsseiten. Schnitte müssen so dick sein, daß sie eine (besser zwei) Reihen völlig unangeschnittener Zellen enthalten. Sind die Zellen relativ hoch (Leitparenchym) oder langgestreckt (Idioblasten, mechanische Elemente), dann wähle man Längsschnitte. Diese sind bei Wurzeln, Stengeln, Blattstielen und -nerven Querschnitten vorzuziehen, da sie nicht so dick zu sein brauchen, um unversehrte Zellen zu enthalten. Überhaupt sind stets bei Lokalisationsermittelungen die an Querschnitten erhaltenen Befunde durch Prüfung von Längs- und Flächenschnitten zu ergänzen. Die Präparation kann besonders bei Blättern einige Schwierigkeiten bereiten. Bei etwas starken Blättern gelingt die Herstellung von Flächenschnitten gut, indem man das Blatt über den Zeigefinger der linken Hand spannt, mit dem Messer die Epidermis schräg anschneidet und das angeschnittene Stück mit der Pinzette abzieht[2]). Nach Entfernung beider Epidermen bleibt gewissermaßen ein Flächenschnitt des Mesophylls zurück. Zur Herstellung von Blattquerschnitten legt man bekanntlich eine Anzahl Blattstückchen aufeinander und klemmt das

[1]) Bei längerer Benutzung der feuchten Kammer empfiehlt es sich, dem Wasser ein wenig Kresol oder Phenol zuzusetzen, um zu verhindern, daß das Material schimmelt.

[2]) In ähnlicher Weise fertigt man Längsschnitte aus Stengeln, Blattstielen u. a. an.

Päckchen zum Schneiden zwischen Hollundermark ein. Bei starken, lederartigen Blättern (Arctostaphylos, Pilocarpus) kann man sich die Präparation erleichtern. Man schneidet mit einer kleinen, scharfen Schere einfach feine Schnipsel ab. Derartige Schnipsel geben recht brauchbare mikroskopische Präparate.

Stark brüchiges Material, von dem man unbedingt größere Schnitte haben muß, wird man unter Umständen vorteilhaft vor dem Schneiden in Glyzeringelatine (Zusammensetzung s. Dauerpräparate) einbetten. Auch zartes lebendes und fixiertes Material kann mit durch Erwärmen flüssig gemachter Gelatine unter dem Rezipienten der Luftpumpe injiziert werden. Fixierte Objekte müssen zuvor gewässert worden sein. Durch Einlegen in Weingeist erfährt die eingetrocknete Gelatine eine weitere Härtung. Aus den Gelatinestücken werden die Schnitte hergestellt; sie gelangen sofort auf den Objektträger. Wenn erforderlich, kann die Gelatine durch gelindes Erwärmen flüssig gemacht und mit Glyzerin und lauwarmem Glyzerinwasser entfernt werden.

Selbst das Schneiden sehr kleiner Objekte, wie Drüsen, Sporen, Pollen, Algen, ist mit freier Hand möglich. Zu diesem Behufe werden die Objekte mit einer dicken Gummilösung vermischt; die Mischung wird auf einen geeigneten Kork aufgetragen und der Kork an einem staubfreien Orte, eventuell im Exsikkator, bis zum Eintrocknen der Masse hingelegt. Einlegen in Alkohol bedingt weitere Härtung. Die durch die harte Gummimasse mit einem scharfen Messer hergestellten Schnitte führen mehr oder weniger Quer- und Längsschnitte der Objekte.

Einige Hinweise erfordert die Präparation verkohlter Pflanzenteile, da das Schneiden dieser mit einiger Schwierigkeit verbunden ist, weil die Präparate selbst bei vorsichtiger Behandlung leicht zerbröckeln und zerfallen. Es empfiehlt sich, derartiges Material zuvor mit Kanadabalsam zu durchtränken. Das Material gelangt zunächst auf einige Zeit in Xylol (um das Eindringen des Balsams zu erleichtern), dann auf 1—2 Tage in Kanadabalsam und wird schließlich etwa eine Woche hindurch an der Luft trocknen gelassen. Auf diese Weise haben Wittmack und Buchwald[1]) verkohlte Getreidekörner behandelt, die sich nunmehr wie frische anfassen und präparieren ließen. Präparate aus stark verkohlten Pflanzen erscheinen unter dem Mikroskop schwarz und lassen von der Struktur des Gewebes wenig erkennen. Bleichen der Präparate mit einem der üblichen Bleichmittel (s. d.) hat wenig

[1]) L. Wittmack u. J. Buchwald, Pflanzenreste aus der Hünenburg und eine verbesserte Methode zur Herstellung von Schnitten durch verkohlte Hölzer, Ber. deutsch. bot. Ges., 1902, XX, S. 21.

oder gar keinen Erfolg. Netolitzky[1]) hat daher die Aschenskelette der Präparate (s. d.) zur Diagnose herangezogen, die vornehmlich dort, wo verkieselte Membranen vorliegen, gute Dienste leisten. Diese Methode haben Wittmack und Buchwald bei verkohltem Holz benutzt und zunächst größere Stücke des Materials vorsichtig verascht und aus der Asche die Präparate hergestellt. Die Veraschung muß sehr vorsichtig ausgeführt werden, damit das veraschte Pflanzenstück nicht zerfällt. Es wird dann in heißes verflüssigtes Paraffin übertragen und darin erkalten gelassen. Die in Paraffin eingebettete Asche läßt sich gut schneiden. Die Paraffinschnitte dürfen auf dem Objektträger nur sehr gelinde erwärmt werden. Bei zu starker Erwärmung wird das Paraffin flüssig und der Schnitt zerfließt. Nun wird das undurchsichtige Paraffin mit erwärmtem Xylol ausgewaschen, ein Tropfen Kanadabalsam dem Präparat zugesetzt und sehr vorsichtig das Deckglas aufgelegt.

Bei der Präparation von Braunkohlenhölzern wandte Triebel ebenfalls Kanadabalsam an und stellte dann Dünnschliffe her, während Schmalhausen die Stücke in glyzerinhaltige Gummilösung legte und nach dem Trocknen Handschnitte anfertigte und Gothan[2]) sich des Wachses bediente. Bei der letztgenannten Methode kommt das Objekt auf 2—4 Minuten in absoluten Alkohol, dann wird eine gute Schnittfläche hergestellt und auf 5 Minuten in geschmolzenes Bienenwachs eingelegt, wobei das Wachs während dieser Zeit durch schwaches Erwärmen flüssig gehalten wird. Sobald nach dem Erkalten das Wachs Butterkonsistenz annimmt, wird das Holzstück herausgenommen und ist nach völligem Erhärten des Wachses schnittfähig. Die Schnitte werden in Glyzerin untersucht, das mit etwas Alkohol versetzt ist.

Weiteres siehe im Abschnitt Kohlenstoff.

Bemerkungen über Reagentien und Reaktionen

Absolute Reinheit der Reagentien ist bei mikrochemischen Arbeiten noch mehr als bei makrochemischen Untersuchungen Grundbedingung, denn bei den minimen Mengen der in Reaktion tretenden Substanzen wirkt jede Beimischung weit leichter störend. Nur in seltenen Fällen ist die Beimischung eines ganz bestimmten Stoffes im Reagens vorteilhaft, so beim Alaunnachweis mit Cäsiumchlorid (das eine Spur von Cäsiumalaun enthält). Beim Arbeiten mit Schnitten wird man von dem

[1]) Fr. Netolitzky, Mikroskopische Untersuchung gänzlich verkohlter vorgeschichtlicher Nahrungsmittel aus Tirol, Zeitschr. d. Nahrungs- u. Genußmittel, 1900, III, S. 401.

[2]) Näheres bei W. Gothan, Über die Präparation von Braunkohlenhölzern zur mikroskopischen Untersuchung, Naturwiss. Wochenschr., Jena 1904, XIX, S. 574.

sog. Impfen absehen (Zusatz einer Spur der gleichen Substanz zu träge und schlecht kristallisierenden Stoffen) und selbst beim Arbeiten mit Lösungen umgeht man es tunlichst. Der Konzentrationsgrad der Reagentien — zu deren Herstellung stets destilliertes Wasser genommen werden muß — läßt sich nur von Fall zu Fall bestimmen. Dies gilt auch für die Reagentien auf organisierte Zellbestandteile und auf Membransubstanzen (Jodjodkalium, Chlorzinkjod). Im allgemeinen sind die Reagentien, entgegen vielen Literaturangaben, nicht in konzentrierter Lösung anzuwenden. Verschiedene Fällungen lösen sich im Überschuß der Reagenzlösung leicht auf; es wäre in diesem Fall am richtigsten, wenn die reagierenden Stoffe im Verhältnis ihrer Atom- oder Äquivalentgewichte zusammentreten würden.

Der **Aufbewahrung der Reagentien** ist besondere Sorgfalt zu widmen. In dieser Hinsicht wird sehr gesündigt. Korkstöpselflaschen mit eingelassener feiner Pipette zum Ansaugen (ohne Kautschukkappe), die man in den Reagentienblocks antrifft, sind nicht praktisch. Bei den Kautschukpipetten (Augentropfgläser und -fläschchen) hält sich die Kautschukkappe nur beschränkte Zeit. Sie wird vorteilhaft in der von Schürhoff[1]) gegebenen Anordnung durch eine Glaskappe ersetzt. Über den oberen Teil des Pipettenrohres kommt ein etwa 1 cm breiter, mit Glyzerin befeuchteter Kautschukring und darüber als Ersatz für die Kautschukkappe ein fest anschließendes, am oberen Ende zugeschmolzenes Glasrohr. Durch Heben und Niederdrücken dieser Glasrohrkappe werden die Reagentien entnommen (Fig. 1). Man wählt am besten durchweg braune Fläschchen, die mit verdünnter Salzsäure ausgekocht und mit destilliertem Wasser gründlich ausgewaschen wurden. Vielfach werden sich Flaschen mit eingeschliffenen Glasstöpseln eignen, die mit einer Spur Wachs oder Fett gut eingerieben und bei manchen Reagentien (Chloralhydrat) mit angeschmolzenen Glasstäbchen versehen sind. Bei verdünnten Laugen sind Stöpsel aus gutem Kautschuk oder Holz längere Zeit haltbar. Für ölig-harzige Flüssigkeiten, insbesondere für Kanadabalsam, sind insbesondere Flaschen im Handel (nach Schuberg, A. Meyer, Kunz-Krause), bei denen ein Beschmutzen des Glases und der Finger ausgeschlossen ist. Bei dem Glase von Kunz-Krause Pharm. Zentralh. 1912, LIII, S. 36), das von Franz Hugershoff, Leipzig, zu beziehen ist, ist der Tropfstab verstellbar und endet in eine „durch

Fig. 1. Tropfglas mit Glaskappe nach Schürhoff

[1]) P. Schürhoff, Pipettenglas für mikroskopische Pharm. Ztg., 1906, LI, S. 931.

einen merklich verjüngten Teil verbundene Kugel", wodurch „die jederzeitige Absetzung der Flüssigkeit in Form eines, und zwar stets gleich großen Tropfens" ermöglicht wird. Übrigens müssen relativ oft die erforderlichen Lösungen frisch bereitet werden. Wo diese Vorschrift besteht, befolge man sie und greife nicht aus Bequemlichkeit nach einer, wenn auch „nur einige Tage" alten Lösung (Alkaloidreagentien). Zur sorgfältigen Aufbewahrung gehört ferner, daß man die Reagentien beim Gebrauch nicht unnötig lange offen stehen läßt. Die Unsitte, Reagentien mit eingetauchtem Glasstabe stundenlang, selbst über Nacht, offen stehen zu lassen, scheint leider vielfach vorzukommen. Es ist doch selbstverständlich, daß, um nur ein Beispiel anzuführen, Schwefelsäure, die häufig gebraucht wird und dabei längere Zeit offen steht, sich nicht mehr in konzentriertem Zustande befindet und ihre Verwendung leicht zu unrichtigen Resultaten führen muß (bei Membranen). Osmiumsäure, über deren Zersetzung man zuweilen klagen hört, wird nicht durch Licht zersetzt[1]), sondern dadurch, daß beim vielfachen Öffnen und bei langem Geöffnetsein der Flasche oxydierbare Substanzen aus der Luft hineingelangen. Außerdem ist die Laboratoriumsluft zu berücksichtigen.

Bei sachgemäßer Entnahme der Reagentien wird ein längeres Geöffnetsein der Reagenzgefäße umgangen. Sind größere Quantitäten zu einer Reaktion oder zu einer Serie von Reaktionen notwendig, dann füllt man die erforderliche Menge auf ein tiefes Uhrglas oder Schälchen, das mit einer Glasplatte bedeckt wird. Bei der Prüfung von Auszügen, bei der man nur geringe Mengen braucht, bringt man einen größeren Tropfen der Reagenzlösung seitlich auf den Objektträger und entnimmt diesem das nötige Quantum mittels eines feinen Glasstäbchens oder einer Glasöse, über deren Anfertigung Schouten[2]) eingehende Angaben gemacht hat. In den meisten Fällen wird man indessen das Reagens direkt zum Präparate bringen und das Standgefäß sofort wieder schließen. Lösungen, die ausschließlich zum Fixieren und Härten für Färbungen dienen, können, wenn sie sich nicht zersetzt haben, filtriert und weiter verwendet werden. Dies gilt vornehmlich für die teuren Fixiermittel. Bei billigen und einfach herzustellenden Lösungen jedoch (Kaliumdichromat bei Gerbstoffen, Kupferazetat bei Harzen u. a.) sieht man von einer mehrmaligen Verwendung ab.

[1]) Osmiumsäure braucht nicht vor Licht geschützt aufbewahrt werden, eine nahezu zweijährige, in einem weißen Glasstöpselglase aufbewahrte Stammlösung ist noch tadellos.

[2]) S. L. Schouten, Methoden zur Anfertigung der gläsernen Isoliernadeln, gehörend zu dem Isolierapparat für Mikroorganismen, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1907, S. 258.

Überwiegend gelangen die Reagentien in Lösungen zur Anwendung, in neuerer Zeit verschiedentlich auch in Dampfform, nicht selten in fester Form. Die erhaltenen Reaktionen sind Quellungs- und Lösungsvorgänge, oder bestehen in Fällungen und Niederschlägen sowie in Färbungen.

Über die **Ausführung** der mikrochemischen Reaktionen lassen sich nur wenige allgemeine Gesichtspunkte hervorheben. Wir wollen mit Hilfe der Reagentien nicht nur die chemische Beschaffenheit der organisierten Bestandteile der Zellen (Membran und Inhalte) feststellen, sondern auch die im Zellsaft in gelöster Form auftretenden Stoffe ermitteln. Vor Ausführung der Reaktion unterrichte man sich eingehend an lebenden Schnitten, bei getrockneten Pflanzen und Pulvern an aufgehellten und an nicht aufgehellten Präparaten über bie Gewebselemente und die Zellinhalte. Die Reaktionen werden überwiegend mit den Präparaten (Schnitten, Pulvern, ausgetretenen Sekreten u. a.) direkt vorgenommen oder (in seltenen Fällen) mit den aus den Präparaten in geeigneter Weise gewonnenen Auszügen und Sublimaten. Die letztgenannte Arbeitsweise, bei der eine Lokalisationsermittelung nur unter bestimmten Verhältnissen (bei vorangegangener mechanischer Trennung einzelner Schichten und Organe) möglich ist, hat mehr für angewandte Zwecke Interesse. Sie kommt jedoch auch für all die zahlreichen Fälle in Betracht, für die derzeit eine Methode zur Ermittelung der Lokalisation noch nicht gefunden ist. Ganz allgemein führen wir unsere Reaktionen am Objektträger aus. Während in der reinen Mikrochemie die Reaktionen seit Behrens an dem einen Ende der Objektträger vorgenommen werden, führen wir sie meist in der Mitte der Objektträger aus. Beide Arbeitsweisen haben ihre Vor- und Nachteile, viel hängt von der Gewohnheit ab. Hingegen ist das Arbeiten in Uhrgläsern, wie es in der toxikologischen Analyse seit langem Brauch ist, nicht zu empfehlen, schon weil ein Hantieren mit Uhrgläsern am Mikroskope umständlich ist. Ist man einmal gezwungen, Reaktionen auf Uhrgläsern vorzunehmen, dann leisten die von Kunz-Krause gute Dienste (Pharm. Zentralh. 1912, LIII, S. 49). Sie sind mit einem Ausguß und mit konzentrischer und radiärer Zonenteilung versehen (Bezugsquelle: Franz Hugershoff, Leipzig). Wir benutzen stets die gebräuchlichen Objektträger aus Glas; sie ersetzen ebenfalls die in der Toxikologie bei Farbenreaktionen im Gebrauch stehenden Porzellanplatten. Um Farbenreaktionen makroskopisch verfolgen zu können, hält man den Objektträger abwechselnd über weißes und schwarzes Papier. (Porzellanplatten sind überdies schwer völlig rein zu halten, wahrscheinlich infolge der kleinen Luftblasen, die Tafner (Ztschr. f. wiss. Mikr. 1911, XXVIII, S. 286) in Porzellangefäßen auffand, der den Grund der sogenannten „launischen Reaktionen“ in dem Gefäßmaterial vermutet.)

Bei der Ausführung der Reaktion an **Schnitten** und mit Reagenzlösungen verfährt man in verschiedener Weise. Die Präparate kommen auf den Objektträger entweder direkt in einen Tropfen der betreffenden Reagentien und werden mit dem Deckglase bedeckt, oder aber man legt sie zunächst in einen kleinen Tropfen Wassers, legt das Deckglas auf, setzt am rechten Deckglasrande das Reagens zu und saugt links die überschüssige Flüssigkeit mit einem Streifen Fließpapier ab. Bei dem direkten Eintragen sind Färbungen und Niederschläge besser lokalisiert; letztere entstehen jedoch oft erst nach längerer Zeit. Bei der Durchsaugungsmethode werden bei Trockenpräparaten die eingetrockneten Gewebe durch das kurze Einlegen in Wasser zunächst ihre natürliche Gestalt zum Teil wieder annehmen. Niederschläge entstehen schneller, ihre Bildung läßt sich leichter verfolgen, doch wird die Lokalisation undeutlich, die Fällungen gelangen infolge der Strömung leichter an sekundäre Lagerstätten. In bestimmten Fällen werden die Reagentien durchgesaugt, um die einzelnen Stadien ihrer Einwirkung kennenzulernen (Chromsäure, Schwefelsäure bei Membranen). In solchen Fällen läßt man das Reagens einige Zeit einwirken und wäscht vor erneutem Reagenzzusatz jedesmal mit Wasser oder Glyzerinwasser aus, um die Wirkung festzustellen.

Besonders zu beachten sind Strömungen, die selbst beim direkten Eintragen der Schnitte lebenden Materials in das Reagens entstehen. Wenn Fällungen an bestimmten Stellen innerhalb lebender Zellen sich anhäufen, so ist diese Erscheinung noch kein Beweis dafür, daß der gesuchte Körper auch an dieser Stelle lokalisiert war. Die Reagentien durchdringen[1]) die Zellwände nicht gleichmäßig an allen Punkten (dünne Membranstellen, Tüpfel), so daß Niederschläge zunächst dort entstehen, wo das Reagens am leichtesten eingedrungen ist. Außerdem ist es nicht ausgeschlossen, daß das eingedrungene Reagens von bestimmten organisierten Bestandteilen (Chromatophoren, Zellkern) der Zelle angesaugt wird, so daß Niederschläge auf diesen zur Ausbildung gelangen können, trotzdem sie in lebendem Zustande die reagierenden Körper nicht enthielten. Auch andere bei der Reaktion nicht beteiligte Substanzen können die Lokalisation der Niederschläge innerhalb der Zellen beeinflussen. Vgl. dazu S. 4.

Umsetzungen von schwer sichtbaren oder leicht löslichen Fällungen in gut sichtbare und unlösliche führt man seit einiger Zeit häufig aus. So werden die schwer sichtbaren gelben Fällungen von Kaliumkobaltnitrit durch Ammoniumsulfid in schwarzes Kobaltsulfid, die

[1]) Das Eindringen der Reagentien kann in vielen Fällen durch schwaches Erwärmen gefördert werden.

leicht lösliche Barytverbindung der Saponine mit Kaliumdichromat in unlösliches gelbes Baryumchromat umgesetzt. Besonders Alkaloidfällungen werden durch Umsetzungen weiter identifiziert (zuerst wohl von Gerock und Skippari, s. Alkaloide). Goldsalze werden durch Schwefelwasserstoff in Schwefelgold übergeführt oder durch Ferrosulfat zu metallischem Gold reduziert, Quecksilbersalze durch Schwefelwasserstoff als Sulfide kenntlich gemacht.

Reagentien in fester Form gelangen bei Schnitten nur hier und da zur Verwendung. So bringt man anstelle von Phosphorsäure ein Körnchen Phosphorsäureanhydrid auf den Objektträger, legt den Schnitt darauf, bedeckt mit dem Deckglase und verflüssigt das Reagens durch gelindes Erwärmen. Kristallisiertes Phenol wird beim Nachweis verkieselter Membranen in gleicher Weise benutzt.

Dampfförmige Reagentien wurden zuerst ausschließlich zum Fixieren benutzt (Osmiumsäure). 1876 gebrauchte Herrmann Ammoniakdampf zum Juglonnachweis. Dampfförmige Reagentien werden herangezogen, wenn man bei Jod- und Bromreaktionen störende Färbungen (der Stärke) vermeiden will, wenn die sich bildenden Niederschläge sehr leicht wasserlöslich sind (Alkaloide), oder wenn die Lokalisation einer Farbenreaktion nicht verwischt werden soll (Juglon, Oxymethylanthrachinone). Als dampfförmige Reagentien (Barth, s. Alkaloide) werden benutzt: Jod, Brom, Chlor, Ammoniumkarbonat (Ammoniak), Salzsäure, Salpetersäure. Die Reagentien gelangen in den Fuß eines kleinen Exsikkators, in dessen oberen Teil die Objektträger mit den trockenen Schnitten gebracht werden. Jod wird durch Bedecken mit einer Sandschicht an zu schneller Verdunstung verhindert, um Brom einwirken zu lassen, genügt es häufig, die Präparate einige Minuten über die offene Bromflasche zu halten. Bei Säuren muß auf niedrige Temperatur geachtet werden, damit nicht gleichzeitig zuviel Wasser mit verdunstet[1]). Der Exsikkator läßt sich natürlich durch andere gut schließende Gefäße ersetzen, in die man passende Glasbehälter stellt, welche die Deckgläser mit den Präparaten aufnehmen. Gleiche Dienste leisten aufeinandergelegte Petrischalen mit eingelegtem Uhrglase als Unterlage für die Objekte sowie die Objektträgern aufgekitteten Glasringe. Aus Säuren mitgerissenes Wasser wird aus den Präparaten im Schwefelsäure-Exsikkator entfernt. Nach Möglichkeit muß jedoch das Übergehen *von Wasserdämpfen durch Kühlstellen des Apparates und durch* nicht zu lange Wirkung der Säuren vermieden werden. Denn durch die Wasserdämpfe tritt der Niederschlag leicht aus den Schnitten heraus

[1]) In manchen Fällen empfiehlt sich aber Erwärmung auf 40° (s. Nachweis der Flavone nach Klein).

und gelangt zum großen Teil auf den Präparaten zur Kristallisation. Die Schnitte werden in Paraffinöl untersucht.

Man kann sich eine derartige Mikro-Gaskammer auf einfache Weise herstellen, indem man den abgesprengten Hals eines Arzneigläschens mit Siegellack auf einem Objektträger befestigt (Fig. 2). Verwendet man Glasringe, so genügt in vielen Fällen Abdichtung durch eine dichte Schicht von Vaseline.

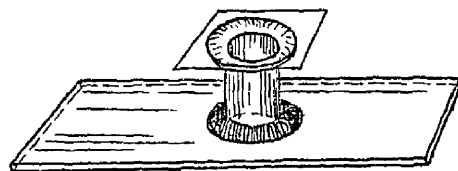



Fig. 2. Mikrogaskammer (aus [illegible] Hals eines Arznei- [illegible] Objektträger)

Über die Verwendung der Mikrogaskammer bei der Bewertung von pflanzlichen Warenproben s. A. Niethammer, Mikrochemie 1930, VIII, S. 53.

In manchen Fällen mag es erwünscht sein, das Gewebe vor dem Angriff von Reagentien künstlich zu schützen. So hat Kretz[1]) Schnitte gegen den Angriff durch konzentrierte Salzsäure dadurch widerstandsfähig gemacht, daß er sie zunächst in eine wässerige Lösung von Natriumsilikat eintrug. Durch die Salzsäure seines Reagens wurde dann die den Schnitt schützende Kieselsäure ausgefällt.

Dauerbeobachtung ist überall dort notwendig, wo Fällungen erst nach längerer Zeit entstehen. Aber auch dann, wenn sich Niederschläge sofort bilden, ist es dringend notwendig, die Präparate nach 1—2 Tagen nochmals zu durchmustern, um die etwa eingetretenen Veränderungen festzustellen, die sich vor allem in der Kristallbildung zeigen. Handelt es sich um Auszüge aus Präparaten und um Fällungen außerhalb der Schnitte, so ist sogar eine Beobachtung nach 1 Woche von großem Vorteil. Man wird erstaunt sein, wie schön manche Körper alsdann herauskristallisiert sind. Insbesondere ist dies notwendig bei Sublimaten, beim Nachweis der Zuckeralkohole, von anorganischen Salzen und Amidokörpern. In anderen Fällen muß die Reagenzlösung vor dem Verdunsten geschützt werden. Man schließt daher die Präparate ein, indem man das Deckglas mit Vaselin oder Wachsterpentin luftdicht umzieht. Diese Anordnung hat Siim Jensen beim Nachweis der Alkaloide (s. d.) getroffen. Das Umranden ist nicht gerade bequem, daher hat sich Tunmann folgender Methoden bedient: Die Kontrollschnitte werden auf einem Uhrglase mit dem Reagens gut durchfeuchtet, das Uhrglas wird mit einer Glasplatte bedeckt, so daß ein Verdunsten unmöglich ist. Nach einem Tage werden die Schnitte auf den Objektträger gebracht und untersucht. Es läßt sich ferner der Hängetropfen

[1]) Fr. Kretz, Über den mikrochemischen Nachweis von Tryptophan in der Pflanze, Biochem. Zeitschr. 1922, CXXX, S. 86.

in der feuchten Kammer benutzen, die man seit langer Zeit zur Dauerbeobachtung und zur Kultur von Mikroorganismen gebraucht (Fig. 3). Aus einem rechtwinkligen Stückchen Pappe, das so dick, doch nicht ganz so breit wie der Objektträger ist und etwa 3—6 cm lang sein kann, schneidet man ein Fenster aus, dessen lichte Weite etwas geringer als die Größe des Deckglases ist. Den Papprahmen läßt man in Wasser vollsaugen, wischt ihn oberflächlich ab und legt ihn feucht auf den Objektträger. Das Deckglas, das den Reagenstropfen mit den Schnitten enthält, wird mit dem Tropfen nach unten (Hängetropfen) auf den Papprahmen aufgelegt. Feuchtet man den Rahmen durch seitlichen Zusatz von etwas Wasser abends an, so bleibt der Tropfen, ohne zu ver-

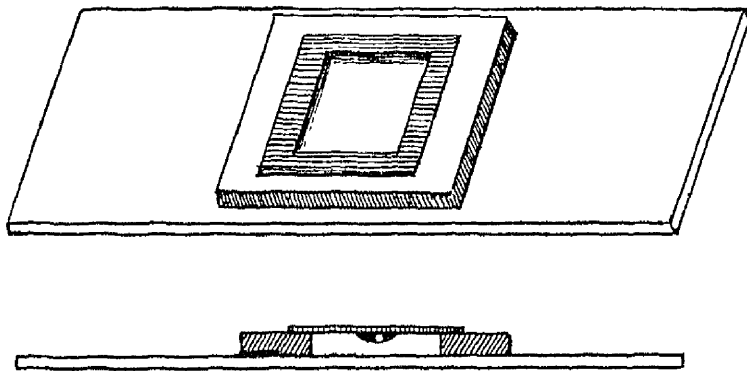



Fig. 3. Feuchte Kammer, angefeuchteter Papprahmen mit aufgelegtem Deckgläschen und Hängetropfen

dunsten, über Nacht erhalten. Die Beobachtung kann direkt geschehen oder man bringt das Deckglas hierzu auf einen anderen Objektträger. Der Hängetropfen läßt sich ebenfalls auf einem Objektträger anbringen. Das einfachste ist schließlich, für derartige Zwecke einen Objektträger zu führen, auf dem ein 1,5 mm hoher und genügend weiter Glasring aufgekittet ist (hierzu können die für die Differentialdiagnose der ätherischen Öle angegebenen Objektträger benutzt werden, s. d., sowie die im Handel befindlichen „feuchten Kammern“, Fig. 4). Vielfach läßt sich die Reaktion auf einem Deckgläschen ausführen. Das Deckgläschen mit dem Präparate wird zur Dauerbeobachtung auf einen ausgehöhlten Objektträger gelegt, den man um die Aushöhlung etwas eingefettet hat. Nicht zu empfehlen ist jedoch ein Aufheben der Präparate in der gebräuchlichen Weise unter einer großen Glasglocke, deren Unterlage feucht gehalten wird.

Fig. 4. Feuchte Kammer mit aufgekitteter Zelle. Grübler & Co., Leipzig

Man versäume nicht, diese Präparate genau zu signieren, sei es mit Fettstift, mit chinesischer Tusche oder mit Papieretiketten.

Auszüge, aus Schnitten oder Pflanzenpulvern mit geeigneten Lösungsmitteln hergestellt, werden im allgemeinen seltener untersucht. Die Extraktion geschieht in einfachster Weise in einem ausgehöhlten Objektträger (Fig. 5). Um zu schnelle Verdunstung des Lösungsmittels zu verhindern, bedeckt man mit dem Deckglase. Auch mit gewöhnlichen Deckglaspräparaten lassen sich Auszüge herstellen. Von einem **Filtrieren** wird man in den meisten Fällen absehen können. Bei quantitativen Arbeiten ist Filtrieren der Auszüge jedoch unerläßlich. Meist wird eine Saugfiltriervorrichtung benutzt, welche aus einer kleinen Glasglocke besteht, die oben 2 Öffnungen besitzt und auf einer Glasplatte ruht. Die eine Öffnung faßt die Filtrierkapillare, welche oben zur Aufnahme des (anzufettenden) Filterchens trichterförmig erweitert ist und unten am Abfluß schräg ausläuft. Durch die zweite Öffnung führt ein Glasrohr zur Wasserstrahlpumpe. Das Filtrat wird in kleine Reagenzgläschen, Schälchen oder in ausgehöhlte Objektträger aufgefangen. Mit dieser Saugpumpe oder mit einer kleinen, ebenso ausgerüsteten Woulfschen Flasche läßt sich Filtration und Extraktion in bequemer Weise verbinden, wie es Grutterink[1]) ausführt.

Fig. 5. Ausgehöhlter Objektträger zum Ausziehen von Schnitten und Pulvern, auch als feuchte Kammer zu benutzen.
Grübler & Co., Leipzig

Fig. 6. Extraktionsapparat in ²/₃ der natürlichen Größe (nach Grutterink).
a Wattepfropfen; *b* zu extrahierende Substanz; *c* mikrochemisches Reagenzrohr (absichtlich schief gestellt, damit der Tropfen die Wand berührt und beim Saugen nicht verspritzt); *d* Sand, Watte

[1]) A. Grutterink, Beiträge zur mikrochemischen Analyse, Dissertation. Rotterdam 1910, S. 34.

In den Trichter kommt ein Wattepropfen, darauf die zu extrahierende Substanz, die mit dem Lösungsmittel übergossen wird. Hierbei kann als Trichter ein kleines, spitz auslaufendes Glasröhrchen dienen; der untere Teil der Woulfschen Flasche wird zur besseren Aufnahme der Filtriergefäße (Reagenzgläser, Schälchen) mit Watte oder Sand angefüllt) (Fig. 6).

Bei dem Mikro-Filtrierverfahren von Hemmes[1]) bringt man neben den zu filtrierenden Tropfen ein höchstens 8—10 mm langes rechteckiges oder trapezförmiges Stückchen lockeres dichtes Filtrierpapier. Setzt man darauf das ebene Ende eines Glasröhrchens oder einer kleinen Pipette, die man nur leicht auf das Papier drückt, so steigt die Flüssigkeit entweder direkt oder durch leichtes Ansaugen in die Glasröhre (Fig. 7).

Abschleppen ersetzt bei unseren Untersuchungen, vorzüglich bei der Extraktion auf dem Objektträger, vollkommen das Filtrieren. Wird die Extraktion im ausgehöhlten Objektträger vorgenommen, so hat man nach vollzogener Extraktion nur die Schnitte oder die Pulverpartikelchen mit der Nadel oder einer Platinöse herauszunehmen. Bei der Extraktion unter Deckglas hebt man das Deckglas an einer Kante und stellt es auf der anderen senkrecht auf. Dadurch sammelt sich der Auszug etwas an und läßt sich durch geeignetes Nachhelfen mit der Nadel an eine andere (reine) Stelle des Objektträgers befördern. In ähnlicher Weise dient das Abschleppen zur Trennung von Niederschlag und Lösung.

Weiteres über mikrochemische Filtrierverfahren s. F. Emich, Mikrochemisches Praktikum.

Die erhaltenen Auszüge werden in sehr dünner Schicht ausgebreitet; an den Rand wird mit Hilfe der Platinöse ein kleines Partikelchen des Reagens in fester Form gebracht (Behrens). Das Reagens löst sich und kommt in verschiedenen Konzentrationen mit der zu prüfenden Lösung zusammen. Wendet man Reagenslösungen an, so bringt man einen kleinen Tropfen dieser neben den Auszug und zieht mit der Nadel einen kleinen Verbindungsfaden zwischen beiden Tropfen. Haupterfordernis ist stets: Arbeiten mit sehr dünnen Flüssigkeitsschichten (flachen Tropfen).

Die **Zentrifugalkraft** kann bei mikrochemischen Untersuchungen der Pflanzen in verschiedener Weise herangezogen werden. Es unterliegt keinem Zweifel, daß beim Nachweis kleinster Substanzmengen in der Zelle ein Zentrifugieren der Objekte vor der Präparation von Vorteil sein wird, da die zusammengeschleuderten Massen relativ leichter zu identifizieren sind. Die spezifisch schwersten Bestandteile werden

[1]) Hemmes, Mikrochemische Glasanalyse. Rec. trav. chim. Pays Bas, 1898, XVI, S. 369.

sich in der Zelle am zentrifugalen Ende ansammeln. Andrews[1]) hat die Wirkung der Zentrifugalkraft bei einigen Objekten (angequollene Samen) studiert und eine Milchzentrifuge benutzt, an deren Scheibe ein Messingzylinder angebracht war, der die Objekte aufnahm. Bei bakteriologischen Studien findet die Zentrifuge oft Verwendung (Kernfärbung der Bakterien [s. d.], A. Meyer). Eine einfache und billige Zentrifuge, die auf dem Prinzip des Trillbohrers beruht, empfahl Cori[2]). Die Zentrifuge für Handbetrieb von H. Behrens ist ebenfalls geeignet und für mikrochemische Zwecke zu empfehlen (Fig. 7).

Für manche Zwecke der Mikrochemie (Einführung von Reagentien und Fixierungsmitteln) dürfte die von Weber[3]) eingeführte **vitale Blattinfiltration** von Nutzen sein.

Das Blatt kommt nach Abtrennung vom Sproß ohne weitere Verletzung in dem Probeföhrchen einer Zentrifuge in die Flüssigkeit, mit der die Infiltration vorgenommen werden soll. Man benutzt eine elektrisch betriebene Zentrifuge mit einer Tourenzahl 1700—2600 in der Minute und einem Achsenabstand des Gegenstandes von etwa 12 cm. Man kann aber auch eine kleine Handzentrifuge benützen. Nach ¼—2 Minuten — je nach dem Gegenstand — Zentrifugieren ist das Blatt vollständig und gleichmäßig infiltriert.

Fig. 7. Kurbel-Zentrifuge d. Ver. Fabr. f. Laboratoriumsbedarf, Berlin N.

Die Webersche Methode kann zu mancherlei Zwecken dienen, man kann damit z. B. die Durchtränkung mit Zelloidin vornehmen. Auch die Durchtränkung von in Alkohol gehärteten Glyzerin-Gelatine-Blöcken mit Terpineol scheint beschleunigt.

Bei nicht zu großer Tourenzahl und nicht zu langer Zentrifugierungsdauer sind Verlagerungen von Zellinhaltsbestandteilen nicht zu befürchten[4]).

[1]) F. M. Andrews, Die Wirkung der Zentrifugalkraft auf Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1903, XXXVIII, S. 1.

[2]) C. J. Cori, Über die Verwendung der Zentrifuge in der zoologischen Technik und Beschreibung einer einfachen Zentrifuge, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1895, XII, S. 303.

[3]) F. Weber, Vitale Blattinfiltration, Protoplasma 1926/27, I, S. 581.

[4]) J. Kisser, Die Verwendung der Zentrifugen-Infiltrations-Methode zur Lösung mikrotechnischer Fragen. Protoplasma 1927/28, III, S. 507.

Zuweilen kann es nötig sein, selten auftretende Elemente aus Pflanzenpulvern zu sammeln. Die Anreicherung geschieht durch **Sedimentieren.** Das Pulver wird in einem kleinen (weithalsigen) Präparatenglase mit Wasser durchgeschüttelt. Das Gemisch läßt man genügend lange absetzen. Sehr leichte Elemente schwimmen als Schaum an der Oberfläche und können mit einem gebogenen Spatel abgehoben werden, die schweren sind im Bodensatz, den man entweder mit einem Glasrohr abhebt oder durch Dekantieren gewinnt. Kleine Spitzgläschen sind recht geeignet zum Sedimentieren. Wenn erforderlich und angängig, wird die Stärke zuvor durch Kochen mit verdünnter Salzsäure verzuckert. Hartwich[1]) hat einen kleinen Sedimentierapparat konstruiert, der im wesentlichen aus 2—3 gut ineinanderpassenden, sich allmählich verjüngenden Glasröhrchen besteht. Die Röhrchen werden ineinandergeschoben; das mit Wasser oder einem anderen Medium angeschüttelte Pulver wird eingefüllt und der Apparat in ein kleines Becherchen gestellt. Nach dem Absetzen finden sich in den einzelnen Schichten der Flüssigkeitssäule die verschiedenen Elemente. Jedes Rohr wird einzeln mit seinem Inhalt abgehoben. Bei dem Absetzen spielt die Größe der Elemente eine erhebliche Rolle; kleinkörnige Stärke erscheint in den oberen Schichten, großkörnige in den tieferen Schichten, ebenso die Oxalatkristalle. Der Hartwichsche Apparat ist recht empfehlenswert. Zu beziehen von Niggli & Co., Zürich.

Oxalatkristalle werden durch Ausschlämmen der fein zerriebenen Pflanzenpulver mit Chloroform gewonnen, Aleuronkörner mit Chloroform, Benzin, Petroleum, Weingeist[2]). Man kann ferner die Inklusen aus den Früchten von Phoenix oder Ceratonia ausschlämmen, ebenso Pigmentkörper, Cystolithen und Kieselkörper. Holzner isolierte Kristalle der Meerzwiebel durch Fäulnis.

Als **direkte Kristallisationsmethode** wollen wir die Methode bezeichnen, bei der unter Deckglas der betreffende Stoff aus Schnitten oder aus Pulvern mit einem geeigneten Medium gelöst wird und sich bei teilweiser oder gänzlicher Verdunstung des Lösungsmediums in kristallinischer Form abscheidet. Da die Kristalle in vielen Fällen zumeist am Deckglasrande entstehen, so sind Identitätsreaktionen bequem auszuführen und die Methode kann an Stelle der Extraktion treten. Das Verfahren, das noch viel zu wenig benutzt wird, wurde von Molisch wiederholt herangezogen, so beim Nachweis von Aloin, der Anthocyane

[1]) C. Hartwich, Die Sedimentiermethode, Schw. Wochenschr. f. Chem. u. Pharmazie, 1907, XLV, S. 544.

[2]) F. Netolitzky, Winke zur Anreicherung von Zellinhaltskörpern zur mikroskopischen Untersuchung, Mikrokosmos 1927/28, XXI, S. 212.

und der Algenfarbstoffe, von Borodin beim Dulzitnachweis und leistete Tunmann beim Nachweis von Sorbit, Methysticin, Hydrastin, Agaricinsäure, Juglon u. a. gute Dienste. Als Lösungs- und Kristallisationsmedien kommen nicht nur Wasser und Weingeist, sondern auch Äther, Azeton, Chloroform, Chloralhydrat u. a. in Betracht.

Als **Abziehmethode** sei an dieser Stelle ein Verfahren bezeichnet, das sich zum Nachweis von an der Oberfläche eines Objektes befindlichen Stoffen benutzen läßt. Es kann bei aufgefärbten Gegenständen zur schnellen Ermittlung des benutzten Farbstoffes dienen. Streicht man nämlich Kollodium auf einen Objektträger und hebt es nach dem Erstarren ab, dann erhält man ein vollkommen durchsichtiges Häutchen, falls der Objektträger trocken war. An den Stellen, an denen der Objektträger Spuren von Feuchtigkeit enthielt, ist das Kollodiumhäutchen trübe. Buscalioni und Pollacci[1]) haben diese Eigentümlichkeit zur Ermittlung der Transpiration der Blätter an Stelle der Stahlschen Kobaltmethode benutzt. Diese Kollodiumhäute geben die feinsten Skulpturen der Epidermen wieder und erscheinen bei mikroskopischer Betrachtung wie die besten Flächenschnitte. Man wird die Kollodiummethode überall dort anwenden können, wo sich Flächenschnitte schwer herstellen lassen oder aus Schonung des Materials unterbleiben müssen. Jost[2]) hat sie bei fossilen Pflanzen ausprobiert, und bei verschiedenen Harzen gab sie ebenfalls schöne Resultate. Auch Abdrücke von Diatomeenschalen hat man mit Kollodium hergestellt[3]).

Kollodiumabdrücke trägt man unmittelbar nach der Ablösung mit der Reliefseite nach oben auf eine dünne Schicht Xylol-Kanadabalsam auf. Die unbrauchbaren Randpartien werden nach dem Eintrocknen des Balsams abgeschert (Naumann)[4]).

Es ist nun ersichtlich, daß das Kollodiumhäutchen alle die der Oberfläche eines Objektes aufgetragenen Stoffe aufnehmen wird, sofern diese im Kollodium löslich sind. Hierzu gehören die in Äther löslichen Stoffe. Wo Kollodium versagt, muß zu einem anderen hautbildenden Lösungsmittel gegriffen werden. So hat Lagerheim[5]) künstliche Färbungen an Kaffeebohnen ermittelt, indem er die Bohnen in eine

[1]) L. Buscalioni e G. Pollacci, L'applicazione delle pellicole di collodio allo studio di alcuni processi fisiologici nelle piante ed in particolar modo alla traspirazione, Atti del istituto botanico Pavia, 1902, VII, S. 1.

[2]) L. Jost, Bot. Ztg., 1902, LX_2, S. 266.

[3]) L. Flögel, Arch. f. mikr. Anat., VI, S. 489.

[4]) E. Naumann, Mikrotekniska Notiser, Bot. Notiser 1915, S. 49. Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk. 1915, XXXII, S. 346.

[5]) G. Lagerheim, Färgardt kaffe och dess undersökning, Svensk Farm. Tidskrift, 1905, Nr. 12.

sirupdicke Lösung von farblosem Zelluloid in Azeton brachte und diese eintrocknen ließ. Die eingetrocknete Haut nimmt die Farbstoffe auf, wird abgezogen und auf dem Objektträger weiter untersucht. Wir trennen mit der Abziehmethode die an der Oberfläche befindlichen Substanzen auf leichte Weise ab und erhalten sie in möglichster Reinheit, wodurch die weitere Diagnose wesentlich erleichtert wird.

Das **Trocknen** von Sublimaten, Niederschlägen, von mit Säuredämpfen behandelten Schnitten u. a. kann in dem bekannten Exsikkator geschehen. Als Ersatz eignen sich genügend große, weithalsige Präparatengläser mit eingeschliffenen Glasstöpseln, auf deren Boden Schwefelsäure oder Chlorkalzium kommt. Eingestellt wird ein leeres Glas zur Aufnahme der Objektträger. Oft dauert hierbei das Trocknen längere Zeit. Schneller kam Tunmann zum Ziel bei Benutzung eines Objektträgers mit aufgekittetem Glasring als Mikroexsikkator. In die Fassung kommt Schwefelsäure oder Chlorkalzium, der abgeschliffene Rand des Glasringes wird etwas eingefettet, und das Deckglas oder der Objektträger mit dem Niederschlag oder dem Sublimate nach unten wird aufgelegt. v. d. Kolk[1]) benutzt bei kleinsten Mengen einen ausgehöhlten Objektträger, in dessen Höhlung ein Tropfen Schwefelsäure kommt. Das Deckglas mit der Substanz wird als Hängepräparat aufgelegt. Hierbei muß man bei Schnitten sehr vorsichtig verfahren, um einen Übertritt der Säure zu vermeiden.

Kristallbildung[2]), die wir bei unseren Reaktionen in erster Linie anstreben, wird als Kriterium für die Reinheit der Körper angesehen, vorzüglich, wenn die gleichen Kristalle beim Umkristallisieren entstehen. Bekanntlich gibt es aber Mischkristalle. Es erscheint fraglich, ob bei Sphärokristallen stets einheitliche Körper vorliegen. Bei mikrochemischen Reaktionen, die direkt mit den Präparaten ausgeführt werden, kann Bildung von Mischkristallen sehr leicht erfolgen. Bemerkenswert ist die Feststellung, daß die Amyrine und das Lupeol, die in den Pflanzen sehr verbreitet sind und häufig als Ester der Zimt- und Essigsäure vorkommen, in Mischkristallen auftreten, die trotz 3- bis 8maligem Umkristallisieren mikroskopisch einheitliche Bilder liefern[3]).

Es ist somit erforderlich, mit den erhaltenen Kristallen möglichst zahlreiche **Identitätsreaktionen** anzustellen. Es kommen nicht nur weitere chemische Umsetzungen, sondern auch Lösungsverhält-

[1]) L. C. Schroeder v. d. Kolk, Beiträge zur Kenntnis der M von Salmiak und Eisenchlorid, Zeitschr. f. phys. Chem., XI, S. 172.

[2]) Durch Benutzung von geätzten Objektträgern läßt sich die Kristallisation nicht befördern; zudem sind geätzte Objektträger schwieriger zu reinigen.

[3]) J. E. Quintus Bosz und N. H. Cohen, Über das sogenannte Chiclegummi, Arch. d. Pharm., 1912, CCL, S. 52.

nisse und Farbenreaktionen in Betracht. Bei Lösungen wird man nicht stets die gleichen Befunde, die die Chemie angibt, erhalten. Wir müssen berücksichtigen, daß minime Mengen vorliegen, welche sich bei Anwendung von relativ großen Quantitäten des Lösungsmittels mehr oder weniger lösen können, trotzdem der betreffende Körper makrochemisch als unlöslich bezeichnet wird. So gelingt es bei wiederholtem kräftigem Durchsaugen von Wasser, kleinere Kalziumsulfatkristalle in Lösung zu bringen. Beim Arbeiten mit Geweben dürfen wir außerdem nicht vergessen, daß in den Schnitten andere, uns unbekannte Stoffe zugegen sein können, welche die Lösungsverhältnisse beeinflussen, das Lösen beschleunigen oder verhindern. Farbenreaktionen bei Kristallen sind recht brauchbar, dienen zwar als Hilfsreaktionen, können aber sogar ausschlaggebend werden.

Borodinsche Probe. Um einen Kristall zu identifizieren, kann man ihn mit seiner gesättigten Lösung übergießen. Er löst sich darin nicht auf, sondern wächst eventuell weiter. Die Borodinsche Probe kann bei Gemischen versagen. Man kann dann noch die Kratzmannsche Impfmethode (s. Chelidonium-Alkaloide) versuchen.

Über die hier weniger in Betracht kommenden Verfahren von Bourquelot und Denigès zur Erzielung von Kristallen aus Lösungen s. Rosenthaler, Grundzüge der chemischen Pflanzenuntersuchung (J. Springer, Berlin), 3. Aufl., S. 11.

Den **Kontroll- und Parallelreaktionen** kommt eine sehr große Bedeutung zu. Verschiedentlich ist, und nicht ohne Berechtigung, eingewendet worden, daß viele mikrochemische Reaktionen nicht eindeutig sind. Insbesondere gilt dieses für die Farbenreaktionen. Wenn wir beispielsweise mit Schwefelsäure eine Rotfärbung im Gewebe erhalten, so besagt die Reaktion sehr wenig, denn bei Gegenwart von Zucker und Eiweiß erhält man bekanntlich eine Rotfärbung (Raspailsche Reaktion). Tritt die Färbung aber auch an gut gewässerten oder selbst an ausgekochten Schnitten ein, dann ist die Farbenreaktion als brauchbare Hilfsreaktion anzusprechen, die sogar bei späteren Untersuchungen und bei weiterer makrochemischer Erforschnng des Objektes wegleitend werden kann. Man hat daher seit Errera (s. Alkaloide) sogenannte —Schnitte zur Kontrolle herangezogen. Als —Schnitte bezeichnen wir Schnitte, denen die betreffenden Körper in geeigneter Weise entzogen worden sind (Alkaloide durch Weinsäure-Alkohol, Zucker durch Wasser). Es werden —Schnitte und + Schnitte mit den gleichen Reagentien behandelt und miteinander verglichen.

Kontrollreaktionen sind ferner mit den Reagentien selbst anzustellen, indem man einen Tropfen der benutzten Lösung auf dem Objektträger eindunsten läßt und den Rückstand durchmustert.

Parallelreaktionen mit chemisch reinen Substanzen müssen, wenn irgend möglich, alle mit dem Pflanzenmaterial erhaltenen Befunde ergänzen. Eigentlich sollten derartige Untersuchungen stets vorausgehen. Leider ist aber nur ein kleiner Teil der Pflanzenstoffe isoliert und genügend gut erforscht. Relativ gering ist die Zahl der isolierten Substanzen, die im Handel zu haben sind, bei denen es überdies noch oft fraglich ist, ob chemisch einheitliche Individuen vorliegen. So ergibt sich denn die Notwendigkeit, bei Pflanzen, deren Chemie noch unbekannt ist, den die Reaktionen bedingenden Körper selbst zu isolieren. Hierbei wird es nicht einmal auf die absolute Reinheit des isolierten Körpers ankommen, so sehr dieselbe erwünscht sein mag, denn im Gewebe treten organische Verbindungen meist nicht in reiner Form in Reaktion; und über die Form, in der die Pflanzenstoffe nativ vorkommen, sind wir nur sehr mangelhaft unterrichtet. Im allgemeinen wird sich die Mikrochemie nach dem Stande der Phytochemie richten müssen.

Die **Bestimmung der Farben,** die bei Farbenreaktionen und Lösungen entstehen, ist ganz vernachlässigt. Zur genauen Feststellung dienen Farbentafeln. Da viele der in der Literatur erwähnten Farbentafeln nicht mehr im Handel zu haben sind, so ist nach Möllers[1]) Ausführungen der Code des Couleurs von Klincksieck und Valette zu empfehlen. Das Werk enthält auf 24 Tafeln je 30 Farbentöne, zusammen als 720 Farbenangaben. Ferner sei auf die Ostwaldsche Methode hingewiesen[2]).

Beim **Reinigen** verschmutzter Objektträger und Deckgläser vermeide man Kratzen und Schaben mit scharfen Instrumenten. Dadurch entstehen Schrammen, die später beim Mikroskopieren stören. Bei Balsam- und Gelatinepräparaten wird das Deckglas nach gelindem Erwärmen abgehoben. Zum Reinigen wird vielfach Schwefelsäure, sowie Chromatschwefelsäure benutzt[3]). Erwärmen in der Lösung beschleunigt den Reinigungsprozeß. Fette und fettige Harzschmieren reibt man mit Sägemehl oder Zeitungspapier ab. Zur Beseitigung teerartiger Sublimationsprodukte leisten Weingeist oder konzentrierte Kalilauge die besten Dienste. Millons Reagens wird durch verdünnte Salpetersäure entfernt. Allgemeingültige Vorschriften lassen sich natürlich nicht geben.

Die Mikrosublimation

Seit längerer Zeit hat sich die Mikrosublimation als ein brauchbares Hilfsmittel auf unserem Gebiete bewährt. Lokalisationsermittlungen

---

[1]) H. J. Möller, Internationale Farbenbestimmungen, Ber. d. pharm. Ges., 1910, XX, S. 358.

[2]) K. Westermeier, Über den Wert des Ostwaldschen Farbenatlasses bei Blattfarbbestimmungen und Vorschläge zu dessen Ausbau. Beihefte z. bot. Zentralbl., Abt. 1, 1921, XXXVIII, S. 266.

[3]) Zettnow, Reinigen verschmutzter Objektträger und Deckgläser, Zentralblatt f. Bakt. u. Parasitenk., 1894, XV, S. 555.

sind mit Hilfe der Sublimation naturgemäß nicht möglich oder doch nur in jenen Fällen ausführbar, in denen eine mechanische Trennung einzelner Gewebeschichten gelingt.

Wir können die Sublimationsmethoden mit Rücksicht auf ihre Ausführung in vier Gruppen zusammenfassen[1]):

1. Erhitzen der freiliegenden Substanz bis zur Dampfentwicklung, Auffangen der Dämpfe durch in der Hand bereit gehaltene Objektträger.
2. Sublimation im sogenannten geschlossenen Raum.
3. Sublimation zwischen zwei Objektträgern oder zwei Glasplatten.
4. Sublimation im luftleeren und luftverdünnten Raum.

Die Mikrosublimation wurde eingeführt von A. Helwig[2]), der sie für toxikologische Untersuchungen (Nachweis der Alkaloide und anderer Gifte) empfahl. Die Methode wurde nachgeprüft von Guy[3]). Ersterer sublimierte zuerst auf einer Glasplatte, später auf Platinblech, legte um die Substanz 4 Glasleisten und auf diese eine Glasplatte zum Auffangen des Sublimats. Guy verfährt ähnlich, benutzt aber als Unterlage eine Porzellanplatte und nimmt die Sublimation zur Vermeidung höherer Temperaturen auf dem Wasserbade vor. Beide sublimieren im sogenannten geschlossenen Raum. Infolge unberechtigter Kritik kam das Verfahren in Vergessenheit. Erst Behrens[4]) zog es wieder hervor. Er gebrauchte die Sublimation hauptsächlich zur chemischen Charakteristik einiger Alkaloide, dann auch zur Trennung schwer flüchtiger Kohlenwasserstoffe, Phenole und aliphatischer Karbonsäuren. Benutzt wird die Objektträgermethode. Zwei Objektträger werden aufeinander gelegt und an einem Ende durch einen kleinen eingeschalteten Glasscherben (Bruchstück eines Objektträgers) auseinander gehalten. In die eine Ecke des unteren Objektträgers kommt die zu sublimierende Substanz. Da Behrens die Körper erst aus dem Pflanzenpulver isolierte, so waren mit der Sublimation nur geringe Vorteile gegeben, denn mit den Auszügen lassen sich die meisten Reaktionen direkt ausführen. Allerdings war mit der Sublimation eine weitgehende Reinigung verbunden.

Fig. 8. Anordnung der Sublimationsvorrichtung nach Nestler

Die Mikrosublimation gewann erst allgemeines Interesse, als Nestler 1901 die Xanthinbasen durch direkte Sublimation aus Pflanzenteilen gewann. Die Sublimation wurde im sog. geschlossenen

[1]) O. Tunmann, Vergleich. Unters. über die Mikrosublimationsmethoden, Apoth.-Ztg., 1912, XXVII, S. 494.

[2]) A. Helwig, Die Sublimation der Alkaloide und ihre mikroskopische Verwertung für die differentielle Diagnose derselben, Zeitschr. f. analyt. Chem., 1864, III, S. 43.

[3]) W. A. Guy, On the melting and subliming temperatures of the principal poisons organic and anorganic, Pharm. Journ. and Trans., 1867, 2 ser. IX, S. 370.

[4]) N. Behrens, Anleitung zur mikr. Analyse, 1895—1900, 3. Heft.

Raum ausgeführt. Anfangs wurde zwischen 2 aufeinander gelegten Uhrgläsern sublimiert, so daß im Zentrum die Höhe des Sublimationsraumes 1,4 cm betrug. Auf das untere Uhrglas kam die Substanz, dann wurde das andere Uhrglas aufgelegt und mit einer vom unteren Uhrglase 7 cm entfernten Mikroflamme erhitzt. Die Untersuchung des Sublimats in dem Uhrglase unter dem Mikroskop war natürlich umständlich und daher wurde das obere Deckglas später von Nestler durch eine Glasplatte ersetzt. Die Höhe des Sublimationsraumes beträgt jetzt 7 mm, außerdem kam auf die Mitte der Glasplatte ein Wassertropfen zur Kühlung, im übrigen blieb die Anordnung die gleiche (Fig. 8). Die Flamme steht direkt unter dem Uhrglase; die Sublimation beansprucht einige Zeit, eine Temperatur von 80—100° wird in einer halben Stunde erreicht. Höhere Temperaturen verursachen Springen der Gläser. Nestler sublimierte derart Xanthinbasen, Kumarin, Vanillin, Benzoesäure und für leicht flüchtige Substanzen ist das Verfahren recht geeignet. Diese Methode wurde später von Mitlacher beim Nachweis der Oxymethylanthrachinone sowie von anderen Autoren benutzt.

Fig. 9. Mikrosublimation auf der Asbestplatte nach Tunmann

Um höhere Temperaturen zu erzielen, sublimiert Behrens ebenfalls im geschlossenen Raum in nachstehender Weise: Die Substanz wird auf ein Glimmerplättchen gebracht und ein zuvor ausgeglühter und gepreßter Asbestring aufgelegt (1 mm stark, 8—10 mm lichte Weite). Auf den Asbestring kommt ein Objektträger und das Ganze wird auf einen kleinen Drahtring gestellt. Derart lassen sich größere Flammen, selbst Gebläse zur Erhitzung benutzen, und man kann Bleichlorid, selbst Natrium- und Kaliumsulfat zur Sublimation bringen. Da aber der Objektträger bei höherer Temperatur leicht in der Mitte springt, so ist es ratsam, entweder den Ring in eine Asbestplatte von der Gestalt des Objektträgers anzubringen oder das Sublimat auf Deckgläsern aufzufangen. Die Behrensschen Methoden wurden vorzugsweise von den holländischen Forschern benutzt, auf unserem Gebiete besonders von Weevers, der bei der Sublimation alkoholischer Lösungen, die bekanntlich gern breit laufen, das Wijsmannsche kupferne Täfelchen gebrauchte (s. Brenzkatechin).

Die Sublimation auf der Asbestplatte wurde mit Erfolg von Tunmann benutzt. Die Anordnung geht aus Fig. 9 hervor. Auf eine genügend große Asbestplatte (12 × 12 cm) von 2 mm Dicke kommt ein kleines Stückchen eines Objektträgers zu liegen (etwa der vierte Teil eines solchen), größere Glasstücke springen bei höheren Temperaturen leicht. Auf das Glasplättchen oder auch auf ein Blech derselben

Form kommt die zu untersuchende Substanz. Ungefähr 2—3 cm davon entfernt liegt auf der Asbestplatte ein kleines Holz- oder Glasstäbchen von 3—4 mm Höhe und 6—8 cm Länge. Nun wird der Objektträger derart über die Substanz aufgelegt, daß er mit dem einen Ende auf der Asbestplatte selbst, mit dem anderen auf dem Holzstäbchen ruht. Es ist vorteilhaft, daß der aufgelegte Objektträger (Rezipient) das untere Glasstückchen nicht berührt. Die Höhe des Sublimationsraumes ist bei dieser Anordnung 0,5—1,5 mm. Die Asbestplatte ruht auf einem starken Eisenring, der an das Stativ der kleinen Stativlupe von Seibert angeschraubt werden kann. Dadurch stört der Apparat auf dem Mikroskopiertische nicht. Als Flamme wird eine Spirituslampe benutzt, deren Spitze die Unterseite der Asbestplatte erreicht, und die je nach Bedarf 2—5 cm hoch gehalten wird. Selbstverständlich wird man beim Suchen nach flüchtigen Substanzen zuerst mit kleiner Flamme arbeiten. Die Rezipienten werden nach Beginn des Erhitzens alle Minuten gewechselt. Während man mit der rechten Hand den einen abhebt, wird der in der linken Hand bereit gehaltene aufgelegt. Das Wechseln kann sehr schnell ausgeführt werden. Anfangs ging Tunmann von der in der Literatur vertretenen Anschauung aus, daß das Wechseln der Rezipienten nur zwecks Auffangen mehrerer Sublimate zu geschehen habe. Diese Ansicht erwies sich indessen als irrig. Sublimiert man beispielsweise Rheumpulver ohne Wechseln der Rezipienten einige Minuten, dann entweichen die Sublimationsdämpfe an beiden Seiten. Das Entweichen der Gase erfolgt bei lebhafter Sublimation selbst bei Kühlung des Rezipienten durch aufgetragene Wassertropfen. Der Sublimationsraum ist in solchen Fällen mit Dämpfen in kurzer Zeit völlig erfüllt, die Dämpfe können sich nicht genügend schnell niederschlagen und entweichen seitwärts. Das Entweichen der Gase wird also ebenfalls durch zu reichliche Gasentwicklung veranlaßt. Ein geringer Verlust an Material erfolgt allerdings beim Wechseln der Rezipienten. Dieser wird jedoch durch das leichte und handliche Wechseln auf ein Minimum beschränkt. Außerdem kann man das Wechseln einschränken, indem man das Stäbchen beim Beginn der Sublimation möglichst nahe an die Glasplatte bringt, so daß der Rezipient ebenfalls entsprechend weit nach links zu liegen kommt und nun während der Sublimation Stab und Rezipient langsam nach rechts schiebt. Auf diese Weise erhält man ein strichförmig ausgezogenes Sublimat. Doch ist das Wechseln vorzuziehen.

Die abgehobenen Rezipienten kommen mit den Sublimaten nach unten auf ein Gestell; vornehmlich für die ersten Sublimate, welche leicht flüchtige Stoffe enthalten, ist dies angebracht. Von den späteren Sublimaten kann man das eine sofort auf den (kalten) Objekttisch des Mikroskopes bringen und die durch schnelle Abkühlung hervorgerufenen

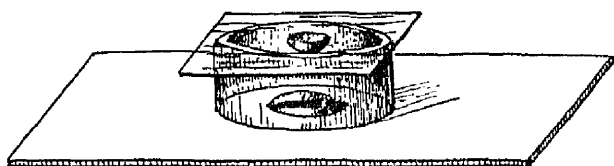
Erscheinungen beobachten. Die Sublimate werden sofort, am nächsten Tage und nach einer Woche untersucht; für die ersten ist baldige mikroskopische Durchmusterung Bedingung, da sich feine Beschläge verschiedener Substanzen schon bei Zimmertemperatur nach kurzer Zeit verflüchtigen, z. B. Kampfer. Die Beschläge sind genau zu durchmustern. Während beim Auskristallisieren aus Flüssigkeiten Zerrformen und Kristallskelette oft am Rande entstehen, finden wir in den Sublimaten gerade die schönsten Kristalle am Rande und Zerrformen in den zentralen Partien, in denen überdies die Kristalle zuweilen so stark gehäuft sind, daß ihre Formen schwer zu erkennen sind. Versuche, geätzte Objektträger zum Auffangen der Sublimate zu verwenden, um derart die Kristallisation zu befördern, brachten keinen Nutzen.

Bei der Sublimation von Pflanzenpulvern (nicht bei Schnitten) können, da der Sublimationsraum sehr niedrig ist, leicht Pflanzenteilchen mitgerissen werden, die dem Ungeübten zu Täuschungen Anlaß geben. Es sind meist Membranstücke epidermaler Zellen und von mechanischen Elementen, also doppelbrechende Elemente. Diese Mißstände lassen sich umgehen, wenn man die Pulver mit einem Tropfen Wasser auf der Glasplatte zu einem dicken Brei verrührt (Tunmann, Gehe's Ber. 1911) Alsdann müssen beim Beginn der Sublimation die Rezipienten allerdings öfters gewechselt werden, da die ersten Sublimate naturgemäß größere Flüssigkeitsmengen enthalten. Wir verbinden hierbei die Mikrosublimation mit einer Mikrodestillation. Des weiteren wird man mit einem durchfeuchteten Pflanzenpulver zuweilen bessere Resultate erhalten wie mit einem trockenen. In solchen Fällen müssen wir annehmen, daß die Zellmembranen durch das Durchfeuchten permeabler für die entweichenden Gase geworden sind, oder daß die sublimierenden Körper durch das warme Wasser zuvor in Lösung gingen und in gelöster Form leichter sublimieren. Bei der Objektträgersublimation muß an einem zugfreien Platze gearbeitet werden. Fensterplätze sind aber häufig dem Luftzug mehr oder weniger ausgesetzt. Ein Luftzug verrät sich schon an der Flamme. Darauf hat vornehmlich der Anfänger zu achten. Um in solchen Fällen ein Entweichen der Dämpfe zu verhindern, kann man zwei Objektträger nebeneinander auflegen (die Länge des Holzstäbchens gestattet dies) oder man stellt einen Pappdeckel vor dem Apparat auf, wodurch die Flamme gleichmäßig wirken wird. Ein vorgestellter Pappdeckel von 20 cm Höhe und 10 cm Breite gestattet in allen Fällen die Wahrnehmung der geringsten Dampfentwickelung und selbst sehr schwache Gerüche lassen sich deutlich ermitteln.

Die Vorteile des eingehend geschilderten Verfahrens sind vorzüglich folgende: Der Apparat hat eine stabile Lage, gestattet die An-

wendung von Temperaturen bis zu 300° (höhere wurden nicht erprobt), ohne daß Verluste durch Bruch zu beklagen sind, sowie ein leichtes und schnelles Wechseln der Objektträger. Durch die Heranziehung höherer Temperaturen wird die Sublimationsdauer auf fünf Minuten herabgesetzt; auch sind weit mehr Erfolge zu erzielen. Die Methode liefert übereinstimmende Resultate. Die einfache Apparatur gestattet die Ausführung der Sublimation neben dem Mikroskop, ein Umstand, der für den Mikroskopiker von wesentlicher Bedeutung ist. Hierzu kommen als weitere nicht zu unterschätzende Vorteile, daß die Sublimate (nach Bedarf in Serien) auf den Objektträgern erhalten werden und schließlich, daß sich der beim Erhitzen auftretende Geruch feststellen läßt. Gerade der Geruch, den man bisher nicht beachtete, kann für die Diagnose von großer Bedeutung werden. Manche Pflanzen und Drogen lassen selbst in Mischungen ihren spezifischen Sublimationsgeruch erkennen. Nach einiger Übung lassen sich nicht unwichtige diagnostische Anhaltspunkte herausfinden.

Da man bei der Tunmannschen Vorrichtung stets Verluste durch seitliches Entweichen der sublimierenden Stoffe erleidet, so ist die Verwendung der Molischschen Glaskammer (Fig. 10) vorzuziehen. Man setzt den unten gut eben abgeschliffenen Glasring ohne Kitt auf den Objektträger, erhitzt nach Eingabe der Substanz auf der Asbestplatte und verfährt im übrigen, wie im vorhergehenden angegeben.

Fig. 10. [illegible] Kammer [illegible]

Die geschilderten Verfahren teilen mit allen anderen Methoden den Nachteil, daß sie eine genaue Feststellung der Sublimationstemperatur nicht gestatten. Der Chemiker, der mit Recht gewohnt ist, dem Schmelzpunkt und der Sublimationstemperatur großen Wert beizulegen, würde wahrscheinlich diesen Nachteil als einen großen bezeichnen, auf alle Fälle sehr überschätzen. Die Sublimation verläuft bei den einzelnen Methoden unter verschiedenen Bedingungen. Aus diesem Grunde wurde die Höhe des Sublimationsraumes angegeben. Durch das relativ schnelle Steigen der Temperatur wird jedenfalls die Luft im Sublimationsraume verändert. Mehr oder weniger wird beim Erwärmen die Innenluft entweichen können, auch bei den Methoden mit sogenanntem geschlossenen Raum. Chemisch reine Substanzen liefern zum Teil kurz nach Beginn des Erhitzens schon Sublimate. In solchen Fällen schien die angewendete Temperatur nicht die Höhe erreicht zu haben, welche nach der chemischen Literatur zur Sublimation nötig wäre. Naturgemäß ließ sich das Thermometer nicht in den niedrigen Sublimationsraum einführen. Beobachtungen zeigten aber, daß gerade der niedrige Raum zur Erlangung geringer Sublimationstemperaturen beiträgt,

3*

wahrscheinlich durch die schnellere Abkühlung der Dämpfe. Jedenfalls sind bei der geringen Entfernung der aufgelegten kalten Objektträger die ersten Anfänge der Sublimate besser zu beachten als bei makrochemischen Versuchen. Auch waren bei einer Reihe von Substanzen (Kodein- und Hydrastinsalzen) Sublimate bereits sichtbar, ohne daß man, mit bloßem Auge wenigstens, ein Schmelzen der betreffenden Körper bemerkt hätte. Schließlich wären die äußerst geringen Substanzmengen zu berücksichtigen, die auch sonst mikrochemische Reaktionen beeinflussen.

Um die Bestimmung der Sublimationstemperaturen einheitlicher zu gestalten, und um Fehlerquellen, welche beim Auflegen des Thermometers auf Platten unvermeidlich sind, nach Möglichkeit auszuschalten, kann man eine Asbestschachtel benutzen (Fig. 11). Man faltet aus einer genügend großen Asbestplatte (also aus einem Stück) von 2 mm Dicke durch Einritzen und Umbiegen eine kleine Schachtel, deren Höhe nur wenig die Stärke des Thermometers übertrifft. Die Schachtel wird mit dünnem Draht zunächst bis auf eine Schmalseite zugenäht, dann werden die Kanten und Ecken innen mit passenden feinen Asbeststreifen

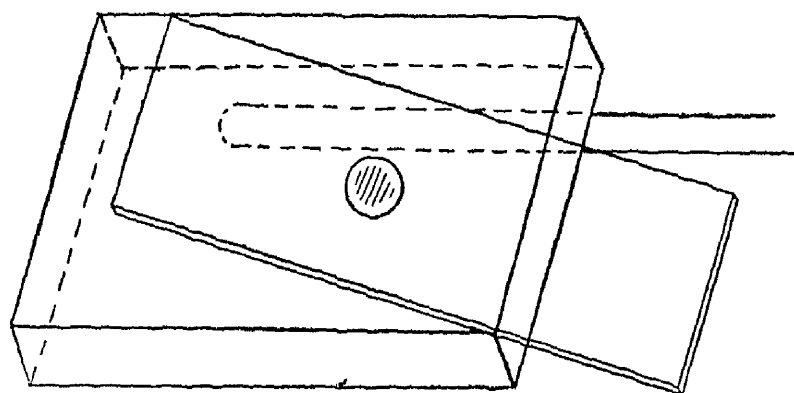



Fig. 11. Sublimation auf der Asbestschachtel zur annähernden Ermittlung der Sublimationstemperatur (Tunmann)

ausgelegt und schließlich wird auch die Schmalseite geschlossen. Vorversuche zeigten, daß innerhalb der kleinen Schachtel die Temperatur beim Erwärmen gleichmäßig steigt. Die Schachtel kommt auf einen Drahtring über die Spiritusflamme. An der rechten Schmalseite erhält sie eine Öffnung, durch die das Thermometer eingeschoben wird, welches an seinem oberen Ende (außen) gestützt wird. Die Schachtel muß so hoch sein, daß das Thermometer weder oben noch unten der Innenwand der Schachtel anliegt. Auf der Oberseite erhält die Asbestschachtel eine zweite Öffnung, in die ein kleines, unten zugeschmolzenes Glasröhrchen eingelassen wird, welches nicht den Boden der Schachtel berührt und an einer Seite dicht an das Quecksilber des Thermometers grenzt. Das obere Ende des Glasröhrchens, das vorteilhaft abgeschliffen ist, steht in gleicher Höhe mit der Oberfläche der Schachtel. Das Glasrohr faßt die zu sublimierende Substanz, läßt sich leicht herausnehmen und reinigen. Man kann die Glasröhrchen umgehen und den Sublimationsraum in noch einfacherer Weise herstellen; man setzt in die Öffnung einen kleinen Glasring ein, für den man in der Schachtel selbst einen Boden aus einem Stückchen Glas bereitet, oder aber man schiebt direkt unter die Öffnung ein Stückchen Glas; in letzterem Falle käme der Sublimationsraum in die Öffnung des

Deckels. Außerdem könnte man den Asbestkasten höher gestalten, wodurch das Thermometer in senkrechte Stellung käme. Die Erfolge mit diesem Apparate waren bisher zufriedenstellend. Es kommt ja für uns nicht darauf an, möglichst übereinstimmende Resultate mit den Temperaturen der Chemie zu erhalten (diese werden bei Benutzung von Drogen und Pflanzenteilen doch kaum zu erreichen sein) als weit mehr darauf, daß verschiedene Beobachter zu übereinstimmenden Werten kommen. Dies ist von vornherein zum großen Teil durch die kleinen Dimensionen der Schachtel gegeben, welche Differenzen durch verschiedenartiges Anbringen von Substanz und Thermometer erschweren.

Die Asbestschachtel[1]) gestattet eine annähernde Feststellung der Sublimationstemperaturen, ohne daß dadurch die Mikrosublimation an sich umständlicher und unbequemer wird, und dies ist ein wesentlicher Vorteil. Auch ist kein Zweifel darüber, daß die Angabe von Sublimationstemperaturen in allen Fällen erwünscht ist, in denen die Reproduktion der Temperaturen sicher möglich ist und ganz besonders in solchen Fällen, in denen bei verschiedenen Temperaturen verschiedene Sublimate entstehen.

Jennrich[2]) bedient sich zur Mikrosublimation folgenden Verfahrens: Eine 6 cm lange, 3 cm breite, auf ihrer Oberfläche rauh geschliffene, aus Jenaer Glas hergestellte Platte nimmt in der Mitte nach unten zu einen konischen Hohlzapfen (oberer Durchmesser 1.5 cm, innere Höhe 1 cm) auf. An den 6 cm langen Außenkanten ist das Glas zur Erzielung je einer Schutzwand von 0,4 cm Höhe nach oben zu rechtwinklig umgebogen[3]) (Fig. 12).

Fig. 12. Vorrichtung zur Mikrosublimation nach Jennrich

In den Zapfen füllt man 0,01—0,02 g möglichst gepulvertes Untersuchungsmaterial so ein, daß der obere Teil des Zapfens, sowie die Platte sauber bleiben und bedeckt mit einem Objektträger. Die Vorrichtung kommt dann auf einen Porzellantiegel, der mit feingesiebtem und dann geglühtem Seesand fast bis zum Rande gefüllt ist und zwar kommt sie nach der Seite; der Zapfen soll zu $^3/_4$ seiner äußeren Höhe von dem Sandbad umgeben sein. In den Sand setzt man bis fast zum Grunde ein Thermometer. Die ganze Vorrichtung befindet sich auf einer Asbestplatte, die mit einem Bunsenbrenner erhitzt wird.

[1]) Die Schachtel wird in verbesserter Form von Dr. R. Muencke, Berlin N, hergestellt.

[2]) H. K. Jennrich, Beitrag zur Kenntnis des Chrysarobins mit besonderer Berücksichtigung neuerer Untersuchungsmethoden. Diss. Hamburg, 1924, Math. naturw. Fak.

[3]) Zu beziehen von Otto E. Kobe in Marburg (Lahn).

Der Objektträger wird während eines Arbeitsganges nicht gewechselt; für Sublimationen bei verschiedenen Temperaturen soll jedesmal ein neuer Versuch angesetzt und frisches Material verwendet werden.

Für die Ausbildung der Kristalle ist es nach Jennrich von Vorteil, den Objektträger nach Erreichung der gewünschten Temperatur noch ½ Stunde auf der Mikrosublimationsplatte zu belassen und dann noch eine Zeitlang in der gleichen Lage auf ein Becherglas oder zwischen gleichhohen Kästen mit dem Sublimat nach unten niederzulegen.

Zur Sublimation von Rückständen aus ätherischen und analogen Lösungen kann das Sublimationsröhrchen von R. Fischer[1]) dienen (Fig. 13). Es ist ein

Fig. 13. Vorrichtung zur Mikrosublimation nach R. Fischer

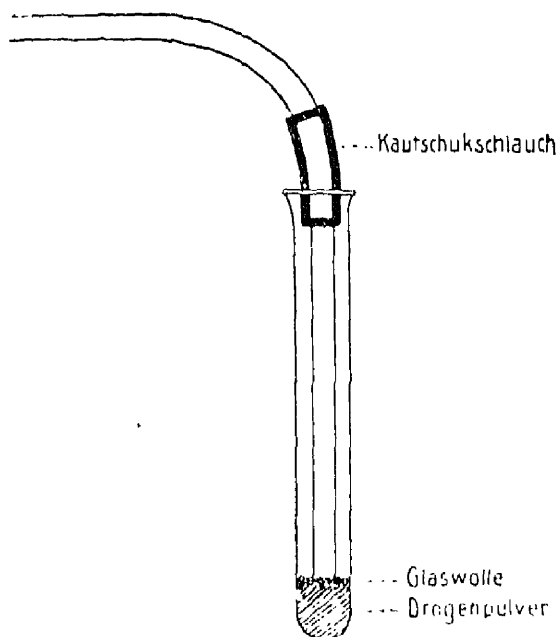



Fig. 14. Vorrichtung zur Mikrosublimation nach Rosenthaler

ungefähr 4 cm langes, oben offenes Röhrchen, das oben einen Durchmesser von 2 cm hat und sich ½ cm über dem Boden plötzlich verengt, so daß der Durchmesser am Boden nur noch 1,2 cm beträgt. Das Sublimationsröhrchen taucht nebst einem Thermometer und einem Rührer, wie er für Schmelzpunktbestimmungen verwendet wird, in ein zur Hälfte mit Paraffinöl gefülltes, etwa 150 ccm fassendes Becherglas. Die abzudampfende Lösung läßt man in das mit dem untersten Absatz in das Paraffinbad eintauchende, auf eine geeignete Temperatur vorerhitzte Sublimationsröhrchen durch einen Kapillartrichter einfließen, dessen Kapillare so weit ist, daß in der Sekunde etwa 1–2 Tropfen hindurchtreten. Zur Durchführung der Sublimation taucht man das Sublimationsröhrchen ungefähr zur Hälfte in das Bad. Ist die nötige Sublimationstemperatur erreicht, so führt man ein in den oberen Teil des Sublimationsröhrchen passendes, rundes Deckglas ein, das man auf der verengten Stelle aufsitzen

[1]) R. Fischer, Nachweis kleinster Mengen von Veronal im Blut und Harn. Pharmaz. Monatshefte, 1927, VIII, S. 195.

läßt. Die Oberseite des Deckglases kühlt man mit einem befeuchteten Stückchen Filtrierpapier, das auch die Herausnahme des Deckgläschens erleichtern soll.

In vielen Fällen ist es von Vorteil, die Sublimation im luftverdünnten Raum vorzunehmen. Die unseres Wissens älteste und einfachste Apparatur dieser Art rührt von L. Rosenthaler[1]) her (Fig. 14). Die zu untersuchende Substanz wird mit Hilfe eines genügend langen Trichters so in ein Reagenzglas gebracht, daß die Seitenwände frei von Pulver bleiben. Über das Pulver kommt eine Lage Asbest, der zusammengedrückt als Filter dient und besonders ein Zerstäuben des Pulvers verhindert. Das Reagenzglas wird mit einem durchbohrten Kautschukpropfen verschlossen, durch dessen Bohrung eine einfach gebogene Glasröhre führt. Am unteren Rand dieser Röhre befestigt man mit Hilfe von ein wenig Glyzerin ein rundes, in der Mitte durchbohrtes Deckglas. Diese Vorrichtung bringt man in ein

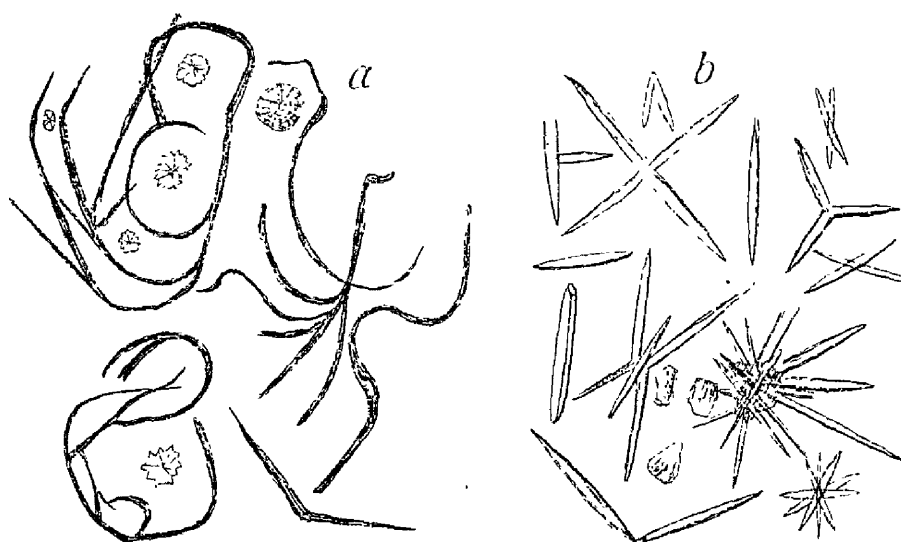



Fig. 15. Kristalle der Oxymethylanthrachinone, aus Rheum auf der Asbestplatte sublimiert; *a*) bei höherer Temperatur, *b*) bei niederer Temperatur. Die bandförmigen Kristalle von *a* lassen sich durch Resublimation bei niederer Temperatur in die kurzen Nadeln von *b* überführen, ebenso die Sphärite von *a* in die Ballen von *b*. Die Kristalle sind nach Photographien kopiert (Tunmann)

mit Thermometer zu versehendes Bad (Becherglas mit Schwefelsäure oder Paraffin oder Sandbad), verbindet mit der Luftpumpe und erhitzt langsam, nachdem man diese in Gang gesetzt hat. Das Sublimat setzt sich am Deckglas an und kann auf diesem bequem unter dem Mikroskop betrachtet werden.

Zur genauen Ermittlung der Sublimationstemperatur ist für chemisch-toxikologische Zwecke in Anlehnung an die Apparate von Kempf[2]) und Riiber[3]), von Eder[4]) ein Apparat konstruiert und bei reinen Alkaloiden erprobt worden. Dieser gestattet Temperaturmessungen an der Stelle, wo der Körper verdampft und wo

[1]) L. Rosenthaler, Pyroanalyse der Drogen, Ber. deutsch. pharmaz. Ges. 1911, XXI, S. 338, 525; 1913, XXIII, S. 577, Schweiz. Apothek.-Ztg., 1924, LXII, S. 381.

[2]) R. Kempf, Praktische Studien über Vakuum-Sublimation, Journ. f. prakt. Chem., 1908, LXXVIII, S. 201.

[3]) C. N. Riiber, Ein neuer Sublimationsprozeß, Ber. d. chem. Ges., 1900, XXXIII, S. 1655.

[4]) R. Eder, Über die Mikrosublimation von Alkaloiden im luftverdünnten Raum, Dissert. Zürich, 1912 u. Vierteljahrschr. Nat. Ges. Zürich, 1912, LVII.

das Sublimat entsteht. Der Apparat (Jenaer Glas, zu beziehen von A. Wittmann, Zürich IV, Sonnegstr.) besteht aus 2 Rohrteilen von 2,5 cm Weite. Der kürzere, untere Teil (4,5 cm lang) verengt sich unten zu einem Zapfen (1 cm lang, 0,5 cm weit), der die zu sublimierende Substanz aufnimmt. Auf das Zäpfchen kommt das (runde) Deckglas. Am oberen, offenen Ende ist dieser untere Teil mit einem verdickten flachen Rand versehen. Dieser ist sehr fein geschliffen und paßt dicht auf das gleich gebaute untere Ende des oberen Apparatenteiles. Letzterer ist 12 cm lang, oben etwas verjüngt und mit dem das Thermometer tragenden Kautschukstopfen verschlossen. Das Thermometer reicht bis ans Deckgläschen. Außerdem befindet sich am oberen Teil ein seitliches Ansatzrohr, welches zum Manometer und zur Wasserstrahlpumpe führt. Der Apparat wird in ein Schwefelsäurebad gebracht, dessen Temperatur während der Sublimation durch ein zweites Thermometer gemessen wird. Dann wird die Pumpe in Gang gesetzt und das Bad angeheizt.

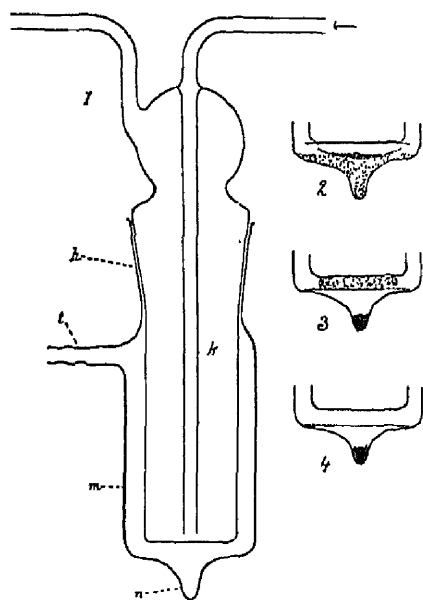



Fig. 16. Vorrichtung zur Mikrosublimation von O. Werner

Später sind noch eine Anzahl von Vakuum-Sublimationsapparaten beschrieben worden, so von Werner[1]) (Fig. 16), (ausgeführt von Glasbläser Ewald, Wien IX, Währingerstr.), Dufoort[2]), Wagenaar[3]) (ausgeführt von Marius, Utrecht, Ganzenmarkt).

Der Wernersche Apparat ist aus starkem Jenaer Glas und besteht aus Mantel und Kühler. Der Mantel *m* trägt an seiner unteren Fläche das Näpfchen *n* und seitlich eine Tubulierung *t* zum Evakuieren. Der Hals *h* mit konischem Einschliff nimmt den genau eingepaßten Kühler *k* auf. Bei der einfachsten Anwendung des Apparates Fig. 16, wird das Näpfchen mit geglühtem Sand gefüllt; auf diesen kommt ein kleines Uhrschälchen mit der Substanz. An die untere Fläche des Kühlers wird mit einem Wassertropfen ein dünnes Deckglas 18 × 18 mm luftblasenfrei aufgesetzt. Nach Beschickung und Evakuierung des Apparates wird die Kühlung in Betrieb gesetzt. Dann wird der untere Teil des Apparates in ein auf ungefähr 100° C vorgewärmtes Sandbad so eingeführt, daß die Oberfläche des im Apparat befindlichen Sandbades um einige Millimeter tiefer liegt, als die des äußeren, welches mit der starken Flamme eines Bunsenbrenners erhitzt wird.

Die Kühlung muß ungefähr so rasch fließen, daß innerhalb 5″ das gesamte Wasser des Kühlers erneuert wird. Um den Hals des Mantels bindet man am besten

[1]) O. Werner, Die mikrochemische Charakterisierung der wichtigsten α-Monoaminosäuren, Mikrochemie 1923, I, S. 33.

[2]) C. Dufoort, Recherches sur la microsublimation. Thèse de doctorat d'Université (pharmacie), Lille 1928.

[3]) M. Wagenaar, Ein einfacher Apparat zur Mikrosublimation im luftverdünntem Raum. Zeitschr. analyt. Chem. 1929, LXXIX, S. 44.

einen Streifen Watte, um das Herunterrinnen des außen an den kalten Teilen kondensierten Wassers zu den erhitzten Partieen des Glases zu verhindern. Man evakuiert mit einer Wasserstrahlpumpe unter Vorschaltung einer Saugflasche.

Durch Mikro-Sublimation lassen sich sehr viele Substanzen in großer Reinheit aus den Pflanzenteilen direkt nachweisen (Gentisin, Ferulasäure, Chinasäure, Shikimisäure, Zitronensäure u. a., Fettsäuren, Arbutin-Hydrochinon, Aesculetin-Gelseminsäure, Zuckeralkohole, Juglone und andere Naphthalinderivate, s. auch S. 31 u. 32). Auch die Spaltlinge verschiedener Substanzen sind unter Umständen diagnostisch wertvoll; zuweilen ist es angebracht, die Hydrolyse mit der

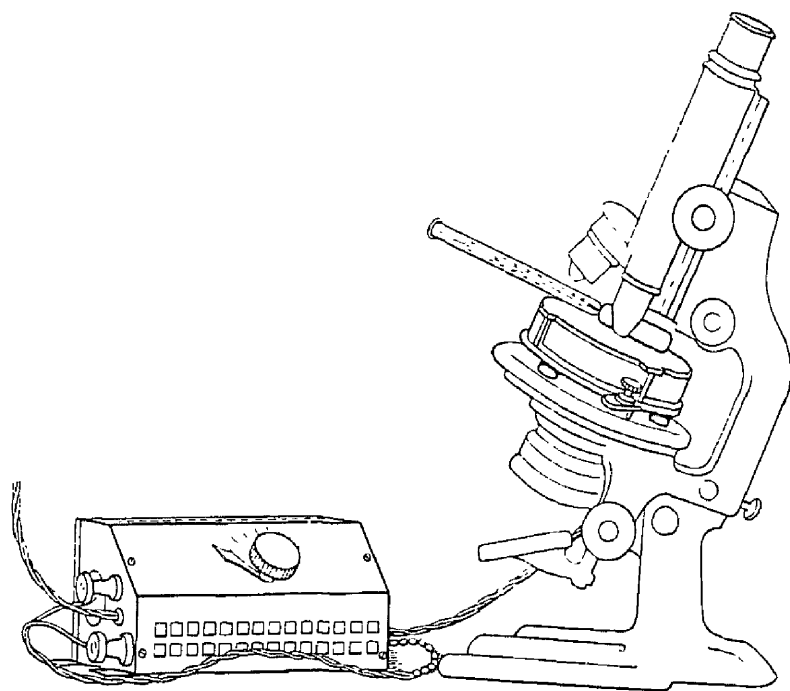



Fig. 17. Mikroschmelzpunktapparat nach Klein mit elektr. Heizung auf dem Mikroskop adjustiert

Sublimation zu verbinden, indem man die Substanz mit einer Spur Salzsäure oder mit Enzymlösung vor der Sublimation auf der Glasplatte vermischt. Kristalle sind, zumal bei Heranziehung höherer Temperaturen, in den Sublimaten der meisten Objekte zugegen, vorzüglich nach längerer Aufbewahrung der Sublimate. Nach den eben aufgeführten Substanzen ist dies nicht sonderbar. Die Schwierigkeit liegt in der genauen Bestimmung der Kristalle; und hierbei sind Fehlschlüsse sehr leicht möglich. Nur ein Beispiel. Man erhält aus einem alkaloidhaltigen Pflanzenteil ein kristallinisches Sublimat. Ähnliche Kristallformen liefert bei der Sublimation das reine Alkaloid. Trotzdem ist der Beweis noch nicht erbracht, daß gerade die Kristalle des aus dem Schnitte erhaltenen Sublimates die Alkaloide darstellen, denn diese

können im amorphen Zustande zugegen sein und die Reaktionen veranlassen, während die Kristalle von anderen Körpern herrühren.

Bei der Identifizierung der Kristalle sind wir in erster Linie auf die chemischen Reaktionen angewiesen. Einmal gelangen die meisten Substanzen in den Sublimaten in Nadeln und Stäbchen zur Ausscheidung, in Kristallformen, die wenig charakteristisch sind, und dann beeinflussen die Temperaturen die Kristallformen. Vorzüglich Nadeln legen sich gern aneinander und verwachsen zu bandartigen Bildungen (Fig. 15).

Fig. 18. [illegible] nach [illegible]

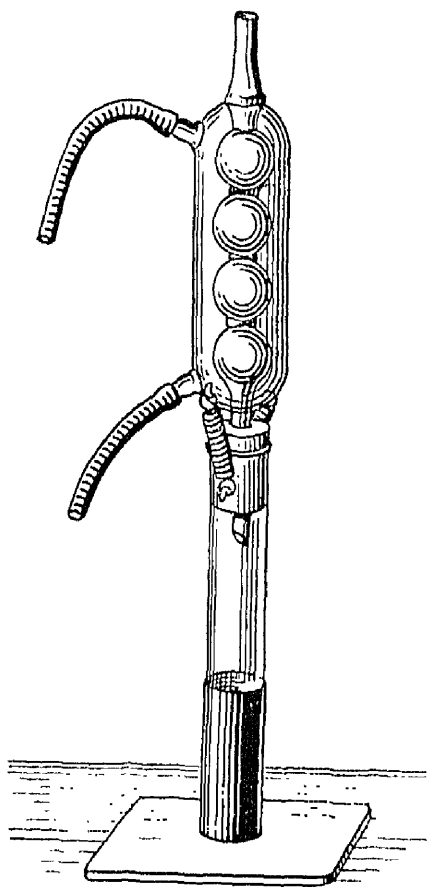
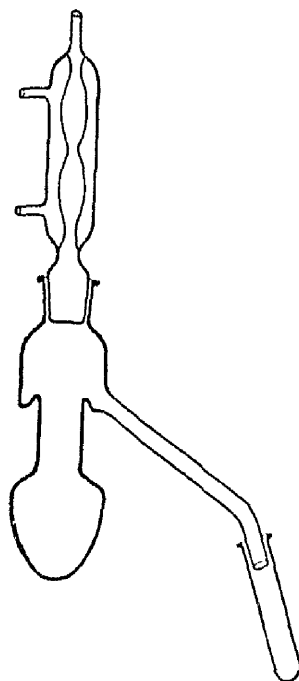



Fig. 19. [illegible]rodestillationsapparat n[illegible] Gawalowski-Klein

Auch die Menge ist von Einfluß (s. Fig. *b*, Ferulasäure). Bei Geg reichlicher Mengen vereinen sich Nadeln und Prismen zu Sternen, Sonnen und verwachsen baum- und strauchartig. Auf die Farbe der Kristalle ist ebenfalls nicht immer ein großes Gewicht zu legen. Sehr feine Kristalle gelber Körper (Gentisin, Rubiadinglykosid, Oxymethylanthrachinone u. a.) erscheinen zuweilen bei mikroskopischer Betrachtung farblos. Färbung und Aussehen isolierter Substanzen hängen nicht nur von der Eigenfarbe jener Körper ab, sondern auch von der Kristall-

form, von der zurückgehaltenen Luft u. a., so daß das mikroskopische Aussehen einzelner Kristallindividuen meist Abweichungen aufweist.

Daran anschließend seien noch einige bei pflanzenmikrochemischen Arbeiten zu verwendende Apparate erwähnt.

Mikroschmelzpunktapparate wurden u. a. konstruiert von H. Weber[1]) (Bezugsquelle Muencke, Berlin N, Luisenstr. 58) und O. Klein (Fig. 17) (Bezugsquelle C. Reichert, Wien). Über einen Apparat zur Bestimmung der Schmelz- und Sublimationstemperatur s. A. Mayrhofer, Pharmazeutische Presse 1922, Folge 9 u. 10.

Ein **Mikroextraktionsapparat** ist von Klein u. Tauböck[2]) konstruiert worden (Fig. 18). Er besteht aus einer Kupferplatte mit aufgelöteter Hülse, in der das Extraktionsröhrchen sitzt. Diesem ist ein Mikrokühler aufgesetzt. Das zu extrahierende Material kommt mit 1 ccm Lösungsmittel oder Bruchteilen davon in das Röhrchen; nach Aufsetzen des Kühlers wird das Kühlwasser eingeschaltet und der Apparat auf einer elektrischen Heizplatte oder mit einer anderen geeigneten Heizquelle angeheizt. Um Reaktionen auszuführen, entnimmt man ein Tröpfchen der Flüssigkeit mit Kapillarpipette.

Für **Mikrodestillation** verwendet Klein eine Modifikation des Gawalowskischen Apparates (Fig. 19).

Aufhellungs-, Quellungs- und Bleichmittel

Aufhellungsmittel bezwecken, Präparate oder einzelne Objekte in den Präparaten für die mikroskopische Betrachtung geeignet zu machen. Die zu benutzenden Aufhellungsflüssigkeiten sollen tunlichst keine Formveränderung hervorrufen, besonders keine Schrumpfung; sie müssen möglichst mit wässerigen Flüssigkeiten, fetten und ätherischen Ölen und Harzen mischbar sein (zwecks weiterer Behandlung der Schnitte). Die Aufhellung geschieht dadurch, daß der Brechungsindex der Flüssigkeit dem des Gewebes genähert wird, ferner durch Quellung (doch darf diese nicht zu stark sein) und schließlich durch Entfernung störender Inhaltsstoffe. Viele Mittel kombinieren die genannten Eigenschaften.

Chemische Aufhellungsmethoden werden mit Vorteil besonders dann ausgeführt, wenn die zu untersuchenden Inhalte durch andere Bestandteile der Zelle verdeckt werden oder der Protoplast störend wirkt, wie bei gewissen Membranstudien. Bei der Wahl der Aufhellungsreagentien muß man selbstredend berücksichtigen, daß einmal die störenden Stoffe

[1]) H. Weber, Über Cammidge-Reaktion und Schmelzpunktsbestimmung unter dem Mikroskop. Naturf. Vers. Karlsruhe, Verh. (1911), 1912, II,[2], S. 125.

[2]) G. Klein und K. Tauböck, Österr. bot. Zeitschr. 1927, LXXVI, S. 195.

in gewünschter Weise entfernt werden und daß anderseits der zu prüfende Körper möglichst unverändert bleibt. Ob und inwieweit letzteres der Fall ist, muß durch Kontrollreaktionen mit nicht aufgehellten Präparaten festgestellt werden.

Das beste Aufhellungsmittel ist in jeder Hinsicht die Chloralhydratlösung, welche als mikrochemisches Reagens von A. Meyer[1]) eingeführt wurde. Sie zeichnet sich durch ihr rasches Eindringungsvermögen, durch ihr großes Quellungsvermögen (Stärke wird bis zur Unkenntlichkeit verquollen) und durch ihren Brechungsindex aus. Eine Lösung von 8 Teilen Chloralhydrat und 5 Teilen Wasser stimmt in der Lichtbrechung mit einem Glyzerin mit 67 % Gehalt an wasserfreiem Glyzerin überein ($n = 1{,}4272$, $n_F - n_C = 0{,}00788$ bei $15{,}3^0$ C) und hat ein spezifisches Gewicht von 1,3677 bei 15^0 C (Lenz)[2]). In der Praxis achtet man weniger auf eine genaue Konzentration der Lösung, sondern hält eine konzentrierte Lösung (5 Chloral + 2 Wasser oder aus gleichen Gewichtsteilen, letztere spez. Gewicht 1,2315 bei 17^0 C, $n = 1{,}4479$ $n_F - n_C = 0{,}01318$ bei $15{,}4^0$ C) vorrätig (zuerst von Lenz empfohlen), von der man soviel zu den Präparaten zusetzt, bis der gewünschte Erfolg erreicht ist, eventuell wird durch Erwärmen, selbst durch Aufkochen nachgeholfen. Beim Sichtbarmachen mancher Niederschläge (Alkaloide) wird man zunächst eine verdünnte Lösung einwirken lassen und diese erst allmählich durch eine konzentrierte Lösung ersetzen. Zur stärkeren Lösung greife man erst dann, wenn die schwächere Lösung selbst nach mehreren Stunden oder nach einem Tage ohne Erfolg war. Das Chloralhydrat der Apotheken genügt stets in bezug auf Reinheit unseren Anforderungen. Sollte sich das Chloralhydrat infolge schlechter Aufbewahrung zersetzt haben, insbesondere Salzsäure enthalten (mit Silbernitrat sofort einen Niederschlag geben), so würde dieser Umstand zwar nicht beim Aufhellen der Gewebe, wohl aber beim Nachweis von kleinen Oxalaten u. a. zu Irrtümern Anlaß geben können. Man kann dann die Lösung mit kohlensaurem Kalk digerieren und nach dem Absetzen filtrieren. Eine konzentrierte weingeistige Lösung, die schon Zimmermann[3]), allerdings nur zur schnellen Extraktion von Chlorophyll empfahl, leistet beim Entfernen schwer löslicher Harze und eingetrockneter Fette gute Dienste. Ihr Quellungsvermögen ist nicht so groß (Tunmann)[4]), wodurch bei Schleimmembranen ein wesentlicher Vorteil gegeben ist.

[1]) A. Meyer, Das Chlorophyllkorn, 1883, S. 29.

[2]) W. Lenz, Bemerkungen über die Aufhellung und über ein neues mikroskopisches Aufhellungsmittel, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1894, XI, S. 18.

[3]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik.

[4]) O. Tunmann, Beitr. z. Kenntnis der Hautdrüsen, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1908, XVIII, S. 503.

Auch ganze Blätter, bei denen man die Verteilung von Oxalaten und anderen, in Chloralhydrat unlöslichen kristallinischen Ausscheidungen (Hesperidin, Scutellarin) ermitteln will, lassen sich meist ohne weiteres durch Aufkochen mit (konz.) Chloralhydratlösung aufhellen. Man kann die Quantität der Kristalle derart annähernd abschätzen und nimmt zweckmäßig das polarisierte Licht zu Hilfe. Oft ist es vorteilhaft, die Farbstoffe zuvor mit Weingeist auszuziehen oder weingeistiges Chloral zu benutzen. Bei ganz alten Blättern genügt Weingeist allein nicht, sondern die Blätter werden „zunächst 2—7 Tage in mit schwefliger Säure gesättigten absoluten Alkohol gesetzt, letzterer 2—3mal gegen reinen Alkohol gewechselt" und dann erst mit Chloral behandelt (Wehmer)[1]. Hier geht dem Aufhellen ein Bleichungsprozeß voraus (s. Bleichmittel, S. 48). In der Anatomie wird in gleicher Weise Schultzes Mazerationsgemisch und Chloralhydrat vielfach angewendet, u. a. von Virchow[2]. Aber diese Methoden sind nicht allgemein brauchbar, wie man nach der Literatur glauben könnte, sondern beziehen sich nur auf spezielle Fälle, denn wenn wir Blätter von Rheum-Arten mit dem Mazerationsgemisch bleichen und in Alkohol auswaschen, dann werden die gebleichten Stücke durch Chloralhydrat rotbraun (H. Miller und Tunmann).

Um in den Futtermitteln das Vorhandensein von Beimengungen oder Verunreinigungen pflanzlicher und mineralischer Natur schnell festzustellen und um die Mengenverhältnisse der einzelnen Bestandteile besser beurteilen zu können, kocht Bredemann[3] eine kleine Probe der zu untersuchenden Substanz auf dem Objektträger mit Salzsäure-Chloralhydrat, einem Gemisch von 10 Teilen Chloralhydrat, 5 Teilen Wasser, 5 Teilen Glyzerin und 3 Teilen 25proz. Salzsäure.

Eau de Javelle wurde als Reagens in der tierischen Histologie seit 1882 von Noll (Vater) benutzt und von Noll[4] (Sohn) 1885 in die botanische Mikrotechnik eingeführt. Die Javellesche Lauge ist ein vorzügliches Lösungsmittel für Plasma; Stärke wird schwer angegriffen. Javellesche Lauge bleicht schneller als Chloralhydrat. Doch steht sie in vieler Hinsicht hinter diesem zurück. Sie findet namentlich Anwendung

[1]) C. Wehmer, Das Verhalten des oxalsauren Kalkes in den Blättern von Symphoricarpus, Alnus und Crataegus, Bot. Ztg., 1889, XLVII, S. 142.

[2]) H. Virchow, Über Bau und Nervatur der Blattzähne und Blattspitzen mit Rücksicht auf diagnostische Zwecke im Gebiet der Pharmakognosie, Arch. d. Pharm., 1896, CCXXXIV, S. 92.

[3]) G. Bredemann, Beiträge zur Futtermitteluntersuchung. Salzsäure-Chloralhydrat als praktischer Hilfsvorgang. Landwirtsch. Versuchsstationen 1913, LXXIX, S. 329.

[4]) F. Noll, Eau de Javelle, ein Aufhellungs- und Lösungsmittel für Plasma, Bot. Centralbl. 1885, XXI, S. 377.

bei Membranstudien, zum Aufhellen der Vegetationspunkte, zu embryologischen Studien u. a. Gewöhnlich wird unter Deckglas aufgehellt, bei Membranstudien im bedeckten Schälchen.

Die Lauge, die gut verschlossen und vor Licht geschützt aufbewahrt werden muß, kann mit Kalium- oder Natriumkarbonat bereitet werden. Zu einer Anreibung von 20,0 Chlorkalk und 175,0 Wasser kommt eine Lösung von 25,0 Natriumkarbonat in 75,0 Wasser. Die Mischung wird nach 4tägigem Stehen im Dunkeln filtriert und so lange mit 10proz. Kaliumoxalatlösung versetzt, bis ein Niederschlag entsteht. Nach dem Absetzen wird nochmals filtriert[1]. Man kann auch eine Anreibung von 20,0 Chlorkalk und 100,0 Wasser mit einer Lösung von 15,0 reiner Pottasche in 100,0 Wasser versetzen und nach mehrstündigem Stehen filtrieren. Überschüssiger Kalk wird durch Zusatz einiger Tropfen Pottaschelösung entfernt (Noll).

Kalilauge war früher das bevorzugte Aufhellungsmittel und wurde von Hanstein[2]) zum Aufhellen der Vegetationspunkte und bei embryologischen Studien empfohlen. Nicht nur Schnitte, sondern auch Blätter, Stengel u. dergl. werden aufgehellt. Bei Schnitten wird eine verdünnte, bei Pflanzenstücken eine etwas stärkere (keine konzentrierte) Lösung benutzt. Über die Dauer der Einwirkung entscheidet die Beschaffenheit der Objekte. Nach der Behandlung mit Lauge folgt Auswaschen mit Wasser und Neutralisation mit Essigsäure oder verdünnter Salzsäure. Tritt bei der Neutralisation zu starke Trübung ein, dann wird mit verdünntem Ammoniak ausgewaschen. Zu durchsichtig gewordene Schnitte erfahren eine Nachbehandlung mit wässeriger Alaunlösung. Russow benutzte eine weingeistige Lauge, um zu starke Quellung zu vermeiden.

Phenol[3]) (kristallisierte Karbolsäure mit 10 % Weingeist versetzt) wurde von Leitgeb bei Moosen zur Aufhellung benutzt, hat sich aber wenig eingebürgert. Schnitte werden beim Erwärmen oft zerstört. Bei Pilzen, Algen, Drogen leistet Milchsäure (vgl. S. 11) gute Dienste. Amann[4]) empfiehlt, speziell für Kryptogamen, Laktochloral (Chloralhydrat und Milchsäure 1 + 1, n = 1,4796), Chloralphenol, n = 1,5241 (2 Chloralhydrat, 1 krist. Phenol), Chlorallaktophenol, n = 1,4932 (2 Chloral, 1 krist. Phenol, 1 sirupdicke Milchsäure), p-Monochlorphenol, n = 1,5761, sowie für Diatomeen Chinolin. Auch verdünnte

[1]) A. Meyer, Grundlagen und Methoden f. d. mikr. Unters. von Pflanzenpulvern, 1901, S. 15.

[2]) J. Hanstein, Die Scheitelzellgruppe im Vegetationspunkt der Phanerogamen, Bot. Ztg., 1868, XXVI, auch Festschr. niederrh. Ges., Bonn 1868, S. 109 und Russow, Mém. de l'Acad. de St. Pétersbourg, sér. VI, XIX, S. 15.

[3]) C. Naegeli u. S. Schwendener, Das Mikroskop, 1877, S. 476.

[4]) Jules Amann, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1899, XVI, S. 38.

Mineralsäuren (verdünnte Salpetersäure) werden zuweilen zum Aufhellen benutzt.

Flüssiges Phenol mit Zusatz von Glyzerin empfiehlt Neumann als Aufhellungsmittel bei Prüfung auf oxalat- oder kieselführende Idioblasten.

Chloralhydrat kann zuweilen, abgesehen von dickeren Präparaten, durch Natriumsalizylat (1 + 1, Brechungsindex 1,449) ersetzt werden, welches mit Nelkenöl (und Phenolen) mischbar ist. Die Schnitte lassen sich somit aus dem Salizylat direkt in Nelkenöl übertragen[1]).

Kofler[2]) verwendete eine Mischung von 10 g Natriumsalizylat, 15 g destilliertem Wasser und 5 g „Kresolum liquefactum". Der Brechungsindex des Gemisches ($n_{D20} = 1{,}4371$) liegt dem der 60proz. Chloralhydratlösung ($n_{D20} = 1{,}4189$) nahe. Stärke, Aleuronkörner und Schleim lösen sich darin beim Erhitzen rasch, die Zellwände quellen nicht.

Als Aufhellungsmittel für Mehle verwendet Plahl[3]) gesättigte wässerige Silbernitratlösung, die Stärke rasch löst. Aufhellungsmittel sind schließlich in speziellen Fällen alle Flüssigkeiten, die den die Beobachtung störenden Bestandteil herauslösen (Weingeist, Äther bei fetthaltigen Geweben). Ammoniak ist bei Polyporus officinalis und wahrscheinlich auch bei anderen harzhaltigen Pilzen u. a. das beste Aufhellungsmittel (Tunmann)[4]); die Agaricinsäure (das Harz) wird sofort gelöst, schneller als von Chloral, ohne daß wie in diesem die Hyphenmembran zum Quellen kommt.

Physikalische Aufhellungsmethoden werden ausgeführt mit Flüssigkeiten, deren Brechungsexponent dem des zu prüfenden Objektes nahe kommt. Gewöhnlich wendet man konzentriertes Glyzerin an, ferner fette Öle (Olivenöl, Rizinusöl), doch auch konzentrierte Rohrzuckerlösung, Pyridin, Xylol, Anilin u. a.

Höher brechende Paraffinöle lichter Farbe sind ideale Immersionsflüssigkeiten. Zu niedriger Brechungsindex kann durch Rizinusöl ($n_{D20} = 1{,}4770$) oder Salizylsäuremethylester ($n_{D20} = 1{,}6111$) erhöht werden (Wasicky)[5]). Becher[6]) empfiehlt Anisol ($n_D = 1{,}5150$), Methylbenzoat u. a.

[1]) W. Lenz, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1894, XI, S. 21.

[2]) L. Kofler, Über Aufhellungsmittel von Drogen, Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie, 1920, XXXVII, S. 213.

[3]) W. Plahl, Gesättigte wässerige Silbernitratlösung als Aufhellungsmittel für Mehle. Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1923, XL, S. 307.

[4]) O. Tunmann, Schw. Wochenschr. f. Chem. u. Pharmazie, 1909, XLVII, Nr. 11.

[5]) R. Wasicky, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1920, XXXVII, S. 206.

[6]) S. Becher, Über Anisol als Immersionsmittel und über andere leicht

Vorzügliche Aufhellungsmedien sind die ätherischen Öle und die Balsame; bei ihnen, zum Teil auch bei Glyzerin ist zur Vermeidung von Kollaps eine Vorbehandlung der Schnitte notwendig. Hierzu wird man in vielen Fällen auch heute noch die einfachsten von Overton[1]) angegebenen Methoden verwenden können. Die Schnitte kommen in ein Uhrgläschen in stark verdünnte Lösungen (10 %), die mit Weingeist (bei ätherischen Ölen) oder mit Wasser (bei Glyzerin) bereitet sind. Das Uhrgläschen wird in den Exsikkator gebracht. Die Lösungen konzentrieren sich allmählich durch Verdunstung des Weingeistes und des Wassers, so daß die Präparate schließlich völlig in Öl oder in fast konzentriertem Glyzerin liegen. Bei Anwendung eines Schwefelsäureexsikkators beschleunigt schwaches Erwärmen des Exsikkators auf 35° die Konzentration bedeutend[2]). Aus Glyzerin können selbst zarte Objekte auch mit absolutem Alkohol behandelt werden, ohne daß Schrumpfungen erfolgen. Will man mit Kanadabalsam aufhellen, dann werden die Objekte zunächst in Xylol übergeführt, indem man sie in einem Uhrglase in eine 10proz. Lösung von Xylol in Alkohol bringt und das Uhrglas in einen Exsikkator stellt, dessen Fuß reines Xylol enthält. Nach einigen Stunden ist die xylolhaltige Präparatenlösung genügend konzentriert[3]). Aus Xylol können die Präparate, ohne daß Kollaps erfolgt, in Xylol-Kanadabalsam übertragen werden.

Als **Quellungsreagentien** kommen die vorstehend genannten chemischen Aufhellungsreagentien in Betracht, außerdem werden herangezogen verdünnte Chromsäure (Stärke), verdünnte Schwefelsäure, Kupferoxydammoniak, Ammoniak, verdünnte Salpetersäure, Kaliumquecksilberjodid (Membran). Die meisten (wasserlöslichen) Schleime quellen bereits bei Zutritt von stark verdünntem Weingeist. Der Quellung bedient man sich zur Sichtbarmachung feinerer Strukturverhältnisse.

Als **Bleichmittel** dienen zunächst stärkere Aufhellungsreagentien, Eau de Javelle, Salpetersäure u. a.; dann mit schwefliger Säure gesättigter Weingeist; auch hat sich Wasserstoffsuperoxyd vielfach bewährt. Es ist aber nur in ziemlich konzentrierten Lösungen wirksam

entfernbare und restlos verdunstende Immersionsflüssigkeiten, Zeitschr. Mikrosk., 1925, XLII, S. 16.

[1]) E. Overton, Mikrochemische Mitteilungen aus dem botanischen Laboratorium der Universität Zürich, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1890, VII, S. 9.

[2]) F. Pfeiffer v. Wellheim, Zur Präparation der Süßwasseralgen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1894, XXVI, S. 674.

[3]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik, 1892, S. 16.

und wird nach Carazzi[1]) vorteilhaft ersetzt durch Natriumperborat. „Bei gewöhnlicher Temperatur lösen 100 ccm Wasser 2,5 g Natriumperborat; erhitzt man aber das Wasser auf 30—35°, so löst sich das doppelte Quantum. Fügt man dann ein wenig Zitronen- oder Weinsäure hinzu, so kann man die Sauerstoffmenge auf das Zehnfache des ursprünglichen Volumens erhöhen.“ Bei Anwendung einer weingeistigen Lösung (50—70 % Weingeist) ist der Zusatz der Säure unbedingt erforderlich. Bei dem Bleichverfahren von Alfieri[2]) kommen die Schnitte in Kaliumpermanganat (1 : 2000), und dann wird das niedergeschlagene braune Manganoxyd durch Oxalsäure (1 : 300) entfernt. Die Prozedur muß bis zum gewünschten Erfolg eventuell einige Male wiederholt werden. In dieser Weise hat Lagerheim[3]) Torf gebleicht, der an der Luft schwarz geworden war. Der Mazeration mit Permanganat folgte eine Behandlung mit 3proz. Oxalsäurelösung im Sonnenlichte. Energischer wirkt Chlorwasser, das auch einfacher in der Anwendung ist. Der Objektträger mit dem Präparate wird auf die Öffnung der Chlorwasserflasche gelegt. Am stärksten bleicht im allgemeinen Schultzes Mazerationsgemisch (konzentrierte Salpetersäure mit einigen Kristallen Kaliumchlorat, s. Mazeration) oder nach Mayer[4]) ein Gemisch von Salzsäure und Kaliumchlorat (Entwicklung von Chlor und Unterchlorsäureanhydrid). Die Wahl des Bleichmittels hängt naturgemäß in erster Linie von der chemischen Beschaffenheit des zu bleichenden Gegenstandes ab. Das Bleichungsverfahren, an sich bereits ein Aufhellungsverfahren, wird oft durch chemische Aufhellungsreagentien verstärkt.

Zur Bleichung von Mineralkohlen-Dünnschliffen bringt Lilpop (Bull. Acad. Sc. Cracovie 1917) die aufgeklebten Dünnschliffe einige Tage bis mehrere Wochen in eine wässerige Lösung von Ammoniumpersulfat, dann in Wasser und dann zumeist in Glyzerin.

Mazerationsmethoden

Unter Mazeration versteht man die Isolierung von Zellen aus den Geweben. Die Methode dient bei histologischen, weniger bei mikrochemischen Studien und gestattet die Gestalt und Größe der einzelnen Zellen zu ermitteln. Die Zellen werden durch die Mittellamelle (Interzellularsubstanz) zusammengehalten, welche sich aus Pektinsubstanzen

[1]) D. Carazzi, Zur Bleichtechnik, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1900, XXVI, S. 526.

[2]) Alfieri, Monit. Zool. Ital., 1897, VII, S. 57.

[3]) G. Lagerheim, Torftekniska Notiser, Geol. Fören. Förhandl., 1903, XXIV, S. 407.

[4]) P. Mayer, Zur Bleichtechnik, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1907, XXIV, S. 353.

aufbaut (s. Pektinmembran), die im Laufe der Entwicklung vielfach ihre Zusammensetzung ändern. Die Mittellamelle ist in ständiger Metamorphose begriffen, sie verschleimt oft. Diese Verhältnisse sind bei der Mazeration zu berücksichtigen. Zuweilen wird die die Isolierung schon durch längeres Kochen mit Wasser erfolgen. In solchen Fällen darf man das Isolierungsvermögen nicht ohne weiteres dem Wasser zuschreiben, sondern muß die im Gewebe anwesenden Substanzen berücksichtigen. Denn wenn wir Schnitte von Rumex durch Kochen mit Wasser mazerieren, so beteiligen sich hierbei jedenfalls auch die in den Zellen befindlichen löslichen Oxalate. Überwiegend werden jedoch stark wirkende Reagentien erforderlich sein; die hauptsächlichsten sind hier angeführt:

Schultzes Mazerationsgemisch steht an erster Stelle, ist bei der Mazeration festerer Gewebe (Holz) unerläßlich und wurde hierzu bereits von Sanio[1]) vielfach erprobt. Bei Schnitten kann die Isolierung unter Deckglas vorgenommen werden. Die Schnitte werden auf dem Objektträger mit Salpetersäure und einigen Körnchen chlorsaurem Kalium versetzt (die dem Volumen nach den Schnitten entsprechen), das Deckglas aufgelegt und erwärmt. Vorteilhafter ist es indessen, schon um selbst sehr große Elemente (Bastfasern) im ganzen Zustande zu erhalten, 2 mm starke und genügend lange Stücke im Reagenzglase mit dem Gemisch bis zur Entwicklung brauner Dämpfe zu erwärmen. Die Stücke werden gebleicht, zerfallen zum Teil in kleinere Teile. Einige Minuten nach dem Erkalten der Flüssigkeit wird diese mit den Objekten in eine große Schale mit Wasser gegossen. Das Wasser wird 2—3mal abgegossen und durch neues ersetzt, dann werden geeignete Stückchen auf dem Objektträger in Wasser oder in Glyzerin zerzupft. Die Reaktion darf nicht im Mikroskopierzimmer, sondern muß unter dem Abzuge vorgenommen werden.

Konzentriertes Ammoniak wurde (neben Kalilauge, Chromsäure u. a.) durch von Höhnel[2]) zur Isolierung der Gewebselemente von tierischen Wollen und Haaren benutzt. Richter[3]) führte das Reagens zu diesem Zwecke in die botanische Mikrotechnik ein. Die Mazeration mit Ammoniak läßt sich durch höhere Temperaturen beschleunigen. Siedendes Ammoniak mazeriert das Parenchym der Kartoffel nach 1 Minute, das Endosperm von Rizinus nach 5, Stengelstücke von Cucurbita Pepo nach 15—20 Minuten; Stärke, Aleuronkörner, Chlorophyll-

---

[1]) C. Sanio, Über die Zusammensetzung des Holzkörpers, Bot. Ztg., 1863, XXI, S. 632.

[2]) F. v. Höhnel, Die technisch verwendeten Faserstoffe, Wien 1888.

[3]) O. Richter, Ein neues Mazerationsverfahren für Pflanzengewebe, Öster. bot. Zeitschr. 1900, LV, S. 5.

körner, Siebröhren bleiben dabei noch gut erhalten. Warmes Ammoniak von 40° mazeriert das Holz von Taxus baccata nach 4, das von Diospyros Ebenum nach 11 Tagen, kaltes Ammoniak das Periderm der Kartoffel nach 23 Tagen. Das Richtersche Verfahren, das Molisch zur Isolierung der Milchröhren benutzte, hat den Vorteil, daß die Zellinhalte relativ gut erhalten bleiben.

Für krautartige Gewächse führte A. Fischer[1]) Mazeration mit Glyzerin-Schwefelsäure ein. Die Präparate kommen unter Deckglas in Glyzerin, alsdann wird am Deckglasrande ein Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt und eine halbe Minute lang aufgekocht. Nur bei starken Präparaten koche man 1 Minute. Längeres Kochen ist zu vermeiden, da die Membranen sonst zu stark quellen. Die einzelnen Zellen werden durch einen Druck auf das Deckglas voneinander getrennt. Durch halbstündiges Kochen mit 10proz. wässeriger Natriumkarbonatlösung (Vétillard)[2]) erfolgt nur unvollständige Trennung. In vielen Fällen wird Kochen mit 50proz. Kalilauge gute Dienste leisten, während die Mazeration mit Chromsäure[3]), deren Konzentration von Fall zu Fall erprobt werden muß, jetzt weniger geübt wird. Die Isolierung mit Chromsäure geschieht vorteilhaft unter Deckglas bei ständiger mikroskopischer Kontrolle. Nach einer 1—3 Minuten langen Einwirkung der Säure wird mit Wasser ausgewaschen; dann lassen sich die Schnitte zerzupfen, oder man muß die Prozedur wiederholen. In speziellen Fällen mazerierte Solla[4]) Früchte mit Oxalsäure oder mit Weinsäure, Möhren und Kartoffeln mit Essigsäure, Wille Laminarien mit Säuren und Sodalösung, Macallum Cyanophyceen mit Pikrinsäure, Kroemer Korkgewebe mit Eau de Javelle. Allgemeine Anwendung kann Salzsäure-Alkohol mit Nachbehandlung mit Ammoniak finden (Mangin), doch wird diese Methode, da zeitraubend, zur Mazeration wenig benutzt (vgl. Pektinmembran).

Unter Umständen wird man die Mazeration gleichzeitig mit Aufhellungsmitteln kombinieren. Auch Natriumsalicylat ist benutzt worden. Die Columella der Illicium-Früchte brachte Lenz[5]) in kleine mit Natriumsalicylat (1 + 1) gefüllte Fläschchen (von 3 ccm Inhalt, sog. homöopathische Gläschen), die, gut

[1]) A. Fischer, Neue Beobachtungen über Stärke in Gefäßen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1886, IV, S. 97.

[2]) M. Vétillard, Etudes sur les fibres végétales textiles, Paris 1876.

[3]) L. Dippel, Anwendung des Mikroskopes auf die Histologie der Gewächse, 2. Aufl., Braunschweig, 1898, S. 215.

[4]) R. Solla, Beiträge zur Kenntnis d. chem. u. phys. Beschaffenheit der Interzellularsubstanz, Österr. bot. Zeitschr., 1879, XXXIV, Nr. 11.

[5]) W. Lenz, Zur anatomischen Unterscheid. d. Früchte v. Illicium religiosum Sieb. und Illicium verum Hook. fil., Arch. d. Pharm., 1899, CCXXXVII, S. 241.

verschlossen, $\frac{1}{2}$ Stunde in strömendem Wasserdampf erhitzt wurden. Die Fruchtspindeln sind nun so weich, daß sie ohne Benutzung schneidender Gerätschaften zerkleinert werden können. Alsdann werden die Objekte nacheinander mit heißem Wasser, Eau de Javelle, Salzsäure und Alkohol behandelt.

Um Mazeration parenchymatischer Gewebe bei vollständiger Erhaltung des Zellinhaltes zu erzielen, behandelt man die Gewebe nach Kisser[1]) bei 45—50° mit 3proz. wässeriger oder weingeistiger Schwefelsäure und insbesondere mit 3proz. wässerigem und weingeistigem Wasserstoffperoxyd. Fixierung mit wässeriger Pikrinsäure lockert die Mittellamellen stark auf, wodurch die nachträgliche Mazeration erleichtert wird.

Die Gewebe werden nach entsprechender Fixierung entwässert und in 96proz. Weingeist übergeführt. In die genannten weingeistigen Lösungen werden sie dann direkt übertragen, in die wässerigen nach einstündigem Auswaschen in destilliertem Wasser. Die Gegenstände kommen dann in kleine, etwa 25 ccm fassende und gut schließende Glastuben und werden dann 9—12 Stunden mit den erwähnten Reagentien behandelt. Die mit wässerigen Lösungen behandelten Gegenstände können direkt mikroskopisch geprüft werden, die mit weingeistigen Lösungen behandelten kommen erst auf 2—3 Stunden in destilliertes Wasser.

Die Gewebe werden durch gelinden Druck auf das Deckglas in ihre Zellen zerlegt, manchmal zerfallen sie von selbst, manchmal ist ein etwas stärkerer Druck auf das Deckglas oder Zerfasern mit der Nadel notwendig.

Die mazerierten Gewebe enthalten in ihren Zellen fast unverändert Kern, Plasma, Chloroplasten und Stärke; in den Mazeraten von Wurzelspitzen waren auch die einzelnen Teilungsstadien der Kerne weitgehend erhalten. Ein Aufquellen der Stärkekörner kann durch Verwendung eines weingeistigen Mazerationsmittels hintangehalten werden.

Vodrážka[2]) läßt folgendermaßen vorgehen. Man bereitet sich zunächst eine Lösung L. I, indem man in ein Tropffläschchen von 50 ccm zur Hälfte Salpetersäure und soviel Kaliumchlorat einfüllt, daß etwa $\frac{1}{3}$ des Fläschchens gefüllt sind. Man stellt sie dann 5 Minuten in siedendes Wasser. Ist die Lösung nach etwa 2—3 Tagen unwirksam geworden (entfärbt), so kann man sie durch Einstellen in kochendes Wasser regenerieren. In eine viereckige Glasschale mit gepreßtem, rundem Hohlraum, wie sie zum Färben von Schnitten verwendet wird, legt man die dickeren Holzschnitte und tropft darauf die Lösung L. I, bei dickeren

---

[1]) J. Kisser, Mazeration parenchymatischer Gewebe bei vollständiger Erhaltung des Zellinhaltes, Planta 1926, II, S. 325.

[2]) O. Vodrážka, Zeitschr. wiss. Mikrosk. 1926, XLIII, S. 178.

Schnitten (½ mm) warm, bei dünneren kalt. Man mischt und bedeckt sofort. Nach Beendigung der Mazeration in dieser Flüssigkeit, die je nach Dicke des Schnitts und der Holzart von 10 Minuten bis mehreren Stunden (Schnitte von ½ mm Dicke) dauert, wäscht man die Schnitte 2—3mal mit Wasser und übergießt sie dann in einem Zentrifugierglas mit einem geeigneten Alkali, bei großen Holzstücken mit konzentriertem Ammoniak oder $^{N}/_{2}$-Kalilauge; bei Schnitten bis 0,2 mm Dicke benützt man ein Gemisch von 50 ccm Wasser und 20 Tropfen Ammoniak oder eine 10proz. Sodalösung. Wenn die Schnitte zerfallen sind, zentrifugiert man und wäscht in der Zentrifuge mehrmals mit Wasser. Man kann mit der alkalischen Mazeration eine Färbung verbinden, indem man 1 Stunde in folgender Lösung beläßt: 50 ccm Wasser + Kongorot + 20 Tropfen Ammoniak + 50 ccm einer einprozentigen Chrysoidinlösung.

Zur Isolierung von Milchröhren kommen folgende Verfahren in Betracht: 1. Wiederholtes Einwirkung von Perhydrol und Kalilauge. 2. ½—1stündiges Kochen in 3proz. Kalilauge. 3. Behandeln mit 25proz. Ammoniak bei ca. 40° und nachherige Trennung mit Nadeln. 4. Verfahren von A. Fischer. Man legt den Schnitt auf einem Objektträger in eine Lösung von Jod in Glyzerin. Nach Aufsetzen des Deckglases setzt man von der Seite einen Tropfen Schwefelsäure zu und erhitzt kurz. Durch leichten Druck auf das Deckglas erzielt man vollständige Mazeration. 5. Zander[1]) legte Stücke von Hanfstengeln in Wasser oder besser in eine ½—2proz. Lösung von Natriumbikarbonat von 25—35°. Im letzteren Fall genügen 4—5 Tage, um die Milchröhren freizulegen.

Die Mikrotomtechnik

Das Mikrotom kann in der Mikrochemie bei gewissen Studien nicht entbehrt werden. Daß zytologische Studien sich nur mit Mikrotomschnitten ausführen lassen, ist bekannt. So hat sich leider die Ansicht herangebildet, daß das Instrument nur für den Zytologen notwendig ist. Ohne dem Schneiden mit freier Hand die erste Stelle absprechen zu wollen, wird man doch der Überzeugung sein müssen, daß verschiedene Fragen der Mikrochemie nicht ohne Mikrotom in wünschenswerter Weise lösbar sind. Überall dort, wo Serienschnitte erforderlich sind, bedarf es des Mikrotoms. Bei Membranstudien wird man öfters auf sehr feine Mikrotomschnitte angewiesen sein, die uns ebenso wie bei der Bildung der ätherischen Öle in den Zellen, auch bei der Entstehung der Membranschleime u. a. Einblicke gestatten, die selbst mit den besten

[1]) A. Zander, Über Verlauf und Entstehung der Milchröhren des Hanfes (Cannabis sativa), Flora 1928, N.F., XXIII, S. 191.

Freihandschnitten nicht zu erhalten sind. Und wenn man bei Niederschlägen Vergleiche über die Menge der betreffenden Substanz anstellen will, dann sind Schnitte von gleicher Dicke nötig, die eben nur das Mikrotom liefern kann.

Sehr verbreitet ist immer noch die Meinung, daß das Mikrotom sich bei Herbar- und Drogenmaterial nicht anwenden lasse. Wir besitzen heute indessen Methoden, die es erlauben Herbar- und auch harte Drogenmaterialien in geeigneter Weise zum Schneiden mit dem Mikrotom vorzubereiten.

Wichtig ist namentlich die Konsistenz des zu schneidenden Materials. Zu harte Objekte müssen bis zu einem gewissen Grade erweicht, zu weiche gehärtet werden.

Härtung: Zur Härtung eignet sich ganz besonders Alkohol, der dem Objekt eine sehr geeignete Schneidekonsistenz verleiht. Sollte dabei eine Überhärtung eintreten, wodurch das Objekt zu spröde wird und beim Schneiden wie Glas splittert, kann es leicht wieder weich gemacht werden. Die Objekte werden einfach in weniger konzentrierten Alkohol übertragen, oder sogar auf kurze Zeit in Wasser. Sehr zu empfehlen ist auch das Strasburger-Flemmingsche Aufbewahrungsgemisch, bestehend aus gleichen Teilen Alkohol, Wasser und Glyzerin, in welchem die Objekte dauernd belassen werden können. Man hat es bei diesem Gemisch auch in der Hand, je nach der Natur des Objektes, die einzelnen Bestandteile zu variieren. Das Wasser oder das Glyzerin können eventuell weggelassen werden. Wasser wirkt erweichend, während Glyzerin die harten Gewebe geschmeidig macht. In manchen Fällen müssen wir zu harte Objekte gehörig erweichen, damit sie überhaupt schneidefähig werden. Dies läßt sich in manchen Fällen bereits durch das oben erwähnte Alkohol-Wasser-Glyzeringemisch erreichen. Nach Kisser[1]) kommt man rascher zum Ziel, wenn man zur Erweichung von lufttrockenen Sammlungs- oder Herbarmaterialien (Blätter, Stengel, Wurzel usw.) folgendermaßen vorgeht: Vom Objekt, das geschnitten werden soll, werden zunächst entsprechende Stücke zugerichtet, diese werden in Wasser einige Minuten aufgekocht und dann noch heiß in ein Schälchen mit kaltem Alkohol übertragen. Der Alkohol bringt die notwendige Härtung, da die Stücke durch das Kochen meist stark erweicht sind. Sehr harte Materialien, wie z. B. Rinden und Kernhölzer, hat Kisser durch Kochen in verdünntem Glyzerin (ca. 30proz.) mit gutem Erfolg geschmeidiger machen können.

[1]) J. Kisser, Untersuchungen über das Vorkommen und die Verbreitung der Pektinwarzen, Jahrb. f. wiss. Botanik, 1928, 68, S. 217.

In neuester Zeit hat J. Kisser[1]) die sog. Dampfmethode ausgearbeitet, die es gestattet, auch die härtesten Objekte mit dem Mikrotom zu schneiden. Das Kissersche Verfahren bedeutet einen großen Fortschritt auf dem Gebiet der Mikrotechnik. Das neue Verfahren geht von der Tatsache aus, daß die **Erweichung** eines harten Materials bei hoher Temperatur am größten ist, mit der Auskühlung dagegen wieder stark zurückgeht. Während des Schneidens wird ununterbrochen ein Dampfstrahl auf das Objekt geleitet. Hierzu bedient man sich am

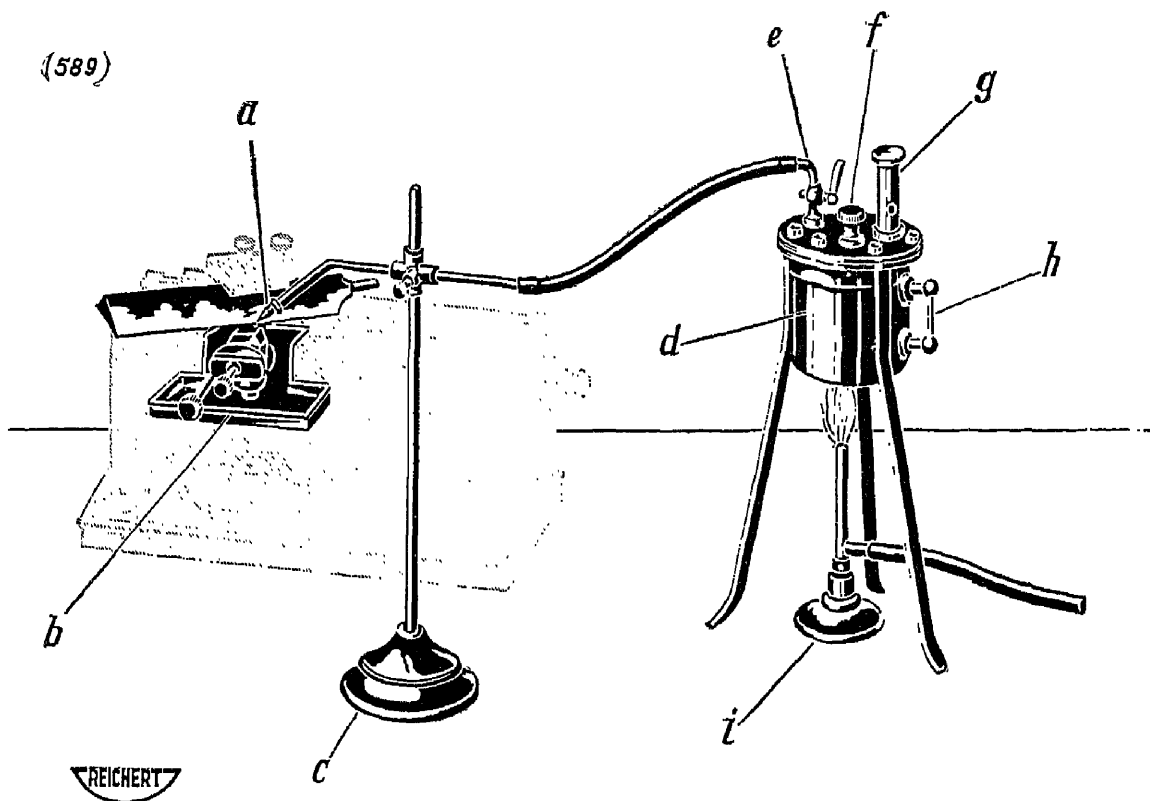



Fig. A. Dampfvorrichtung im Betrieb. *d* Dampfkessel mit Wasserstandsglas *h*, Sicherheitsventil *g* und Öffnung *f* zum Nachfüllen von Wasser. Vom absperrbaren Ventil *e* geht der Dampf durch ein Schlauchstück zu dem am Stativ *c* befestigten [illegible] enen Metallrohr und strömt bei *a* durch die feine Öffnung auf das Objekt aus. [illegible] angebrachte Wanne *b* verhindert, daß die empfindlichen Teile der Mikrotomeinrichtung vom Dampf berührt werden (Nach Kisser)

zweckmäßigsten eines eigenen stabilen Apparates, der nach den Angaben von Kisser von den optischen Werken C. Reichert, Wien, hergestellt wird. Die Dampfmethode ermöglicht es also auch die härtesten Materialien ohne irgendwelche Vorbehandlung, lufttrocken mit dem Mikrotom zu verarbeiten, z. B. Schnitte durch Ebenholz von 6—8 μ Dicke herzustellen. Bei weniger harten Materialien kann das Schneiden dadurch

[1]) J. Kisser, Die Dampfmethode, ein neues Verfahren zum Schneiden härtester pflanzlicher Objekte. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 1926, 43, S. 346—354.

ganz erheblich erleichtert werden, daß man das Objekt mit heißem Wasser ständig berieselt. Dies kann vermittelst einer sehr einfachen Vorrichtung geschehen (Fig. B). In einem Kolben wird Wasser erhitzt und durch Heberwirkung mittelst eines Gummischlauches, der mit einer feinen Kapillare versehen ist, auf das Objekt geleitet. Die Menge des zufließenden Wassers reguliert sich mit einem Quetschhahn. Um das Wasser abzufangen und in geeigneter Weise abzuleiten, bringt man unter den Objekthalter des Mikrotoms eine kleine Wanne, die man sich leicht selber aus dickem Stanniol formen kann.

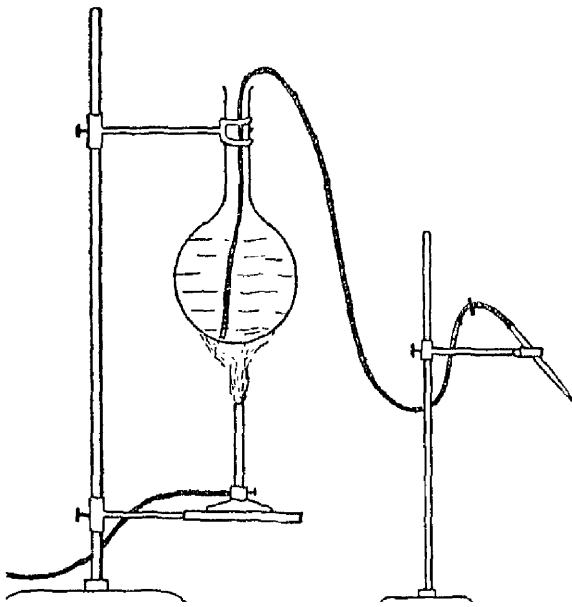



Fig. B. Einfache ichtung zur Berieselung der Objekte mit Wa ser während des Mikrotomierens (Nach Kisser)

Ligninhaltige Gegenstände kann man mit Chlordioxyd-Essigsäure (Schmidts Reagens, Diaphanol), die das Lignin herauslöst, so erweichen, daß sie mit dem Mikrotom geschnitten werden können (Fruchtschalen von Bertholletia excelsa nach 24 Stunden, alte Pfirsichkerne nach drei Tagen, Blätter von Stipa tenacissima nach einer Woche). Die Behandlung mit dem Reagens erfolgt in gut schließenden Glasstop-

Harte Hölzer bringt Kernot erst in Weingeist steigender Konzentration, dann 2 Stunden in reines Azeton und bis 2 Monate in eine 12proz. azetonische Lösung von Zelluloseazetat; vor dem Färben 1—2 Minuten in reines Azeton, dann ebensolang in Weingeist.

Sehr spröde Flechten behandelt Kolumbe[2]) folgendermaßen: Fixieren in Carnoyschen Gemisch, Auswaschen in 96proz. Weingeist, Enthärten in Flemmingschem Aufbewahrungsgemisch, Einbetten in Paraffin über Alkohol, Zedernholzöl, Schneiden, Aufkleben mit Glyzeringelatine, Färbung usw.

[1]) H. Thaler, Zur Verwendbarkeit des Diaphanols in der botanischen Mikrotechnik. Mikrokosmos 1928/29, XXII, S. 21.

[2]) E. Kolumbe, Einige Bemerkungen über die Behandlung schwer schneidbarer und schlecht haftender pflanzlicher Objekte, Mikrokosmos, 1928/29, XXII, S. 16.

Nach v. Büren (private Mitteilung) bewährt sich zum Aufweichen von Flechten auch das Diaphanol (s. S. 56).

Zur Darstellung großer Mikrotomschnitte von harten Hölzern empfiehlt Niesemann[1]) folgendes Verfahren:

Getrocknete Hölzer werden zuerst mit Wasser zur Entfernung der Luft gekocht, harzreiche mit Weingeist. Hölzer oder harte Fruchtschalen mit gummiartigen Pektineinlagerungen werden mit Säuren unter Zusatz von Weingeist vorbehandelt.

Das eigentliche Verfahren setzt mit einer Behandlung durch Flußsäure (Entmineralisierung) ein. Jüngere, weniger harte Teile beläßt man eine Woche in 5- bis 10proz. wässeriger Flußsäure, ältere Stücke nach Zersägung in flache Scheiben mindestens 4 Wochen in 50proz. Die entmineralisierten, wenn nötig, mit einem Faden zusammengehaltenen Stücke bringt man auf einige Tage zur Entfernung des Lignins in 10proz. mit 10 % Ammoniakflüssigkeit versetzte Wasserstoffperoxydlösung. Auftretende Quellungen werden rückgängig gemacht durch kurzes Behandeln mit verdünnter Salpetersäure, Einlegen in 5proz. Natriumnitratlösung und nachfolgendes gründliches Wässern.

Sicherer als durch dieses Verfahren erfolgt der Ligninabbau durch eine mit 10 % Salpetersäure versetzte Chlordioxydlösung[2]). Man beläßt die entmineralisierten Hölzer unter öfterem Umschütteln in dieser wenn nötig erneuerten Flüssigkeit einige Wochen, bis keine Gasblasen mehr aufsteigen und die Präparate schwammigweich geworden sind. Nach kurzem Wässern werden sie in einer 3proz. mit 5 % Natriumnitrat versetzten Lösung von Natriumthiosulfat entchlort. Die Lösung ist mehrere Male innerhalb zweier Tage zu wechseln, bis keine Trübung mehr auftritt. Nach gutem Wässern Überführung in die Alkoholstufen zur Zelloidineinbettung. Die auf Holzblöcke aufmontierten Zelloidinpräparate härtet man in verdünntem Weingeist und bewahrt in Glyzerinweingeist (1+1) auf. Kleinere Gegenstände können auch in Paraffin eingebettet werden.

Die Zelloidinblöcke werden unter Befeuchten mit Weingeist geschnitten; das Aufkleben auf den Objektträger erfolgt mit Oltscher Phenolgelatine[3]).

[1]) H. Niesemann, Die Herstellung großer Mikrotomschnitte von harten Hölzern, Arch. d. Pharmazie, 1930, CCLXVIII, S. 23.

[2]) Zur Darstellung leitet man die durch Erwärmen von 75 g gepulverter Oxalsäure mit 20 g chlorsaurem Kali und 10 g Wasser auf 60° erhaltenen Dämpfe in 250 g Wasser und versetzt mit dem zehnten Teil Salpetersäure. Eine Zersetzung erkennt man an der Entfärbung der goldgelben Lösung.

[3]) 10 g Gelatine werden mit 100 g Wasser bis zur Lösung erwärmt, mit einem Hühnereiweiß geklärt; warm filtrieren, Zusatz von 10 Tropfen Phenol.

Auf die auf dem Objektträger fein verteilte Phenolgelatine legt man die

Zur Färbung bedeckt man das Präparat kurze Zeit mit einer Lösung von 1 g Safranin und 0,2 g Anilinblau wasserlöslich in 100 g Methanol, spült mit Weingeist, differenziert mit 96proz. Weingeist, hellt mit 3proz. Karbol-Xylol auf, bringt in reines Xylol und schließt in Kanadabalsam ein.

Befestigung. Wichtig ist, darauf zu achten, daß die Materialien in geeigneter Weise im Objekthalter des Mikrotoms befestigt werden. Bei Objekten, die in frischem Zustand geschnitten werden sollen, ist eine starke Pressung zu vermeiden, da sonst Zerreißungen in den Geweben auftreten. Es empfiehlt sich in diesem Fall ein Einschließen des lebenden Materials in verflüssigtes Paraffin von niedrigem Schmelzpunkt. Nach dem Erstarren werden entsprechende, das Objekt enthaltende Blöcke ausgeschnitten, die sich nunmehr gut im Mikrotom einspannen lassen. Hierauf gelangen die hergestellten Schnitte in Wasser, wo sich die Objekte herauslösen und zu Boden sinken, während das Paraffin an der Oberfläche schwimmt (Klercker 1891).

Weiche Objekte lassen sich am besten zwischen Hollundermark schneiden, härtere in Flaschenkork. Zur Vermeidung von Quetschungen beim Schneiden weicher zylindrischer Organe, empfiehlt es sich, die beiden Markhälften, zwischen welche sie eingeklemmt werden, in der Mitte mit einer kleinen Rinne zu versehen. Große hohle Organe, wie z. B. Stengel, lassen sich durch Einschieben eines zylindrischen Stückes von Hollundermark, das sich mit einem Korkbohrer in jeder beliebigen Stärke herstellen läßt, in geeigneter Weise versteifen.

Fixierung: Leider läßt sich die Lebend-Untersuchung der pflanzlichen Zelle nur in beschränktem Maße durchführen und wir sind dann auf fixiertes Material angewiesen. Es sei aber hier nachdrücklich empfohlen, wenn eben möglich, auch die Lebendbeobachtung heranzuziehen.

Der Zweck des Fixierens ist der, das Objekt zu töten und zugleich den Zellinhalt in eine feste Form überzuführen, dabei dasselbe aber auch in seinen feinsten Strukturen dem lebenden Zustand möglichst ähnlich zu erhalten. Kein Fixierungsmittel wird jedoch diese Forderung ganz erfüllen. Durch Vergleichen der gewonnenen Bilder mit lebendem Material wird es möglich sein, die Veränderungen wenigstens annähernd festzustellen. Soll eine Fixierung gute Resultate zeitigen, so sind eine Reihe von Regeln hierbei zu beachten. Das Material muß beim Einlegen in die Fixierungsmittel unbedingt vollkommen frisch sein. Durch

Schnitte, darauf ein mit 10proz. weingeistiger Formalinlösung getränktes Fließpapier und drückt mit einem zweiten Objektträger einige Minuten fest an. Die Gelatine wird hierdurch gehärtet, so daß die Schnitte fest anhaften.

Reihenfolge der Manipulationen

Lebendes Objekt
↓
Vorprüfen
↓
Fixieren
↓
Auswaschen

in fließendem Wasser, wenn ein wäßriges Fixiermittel verwendet worden ist

mit Alkohol, wenn ein alkoholisches Fixierungsmittel verwendet worden ist

Entwässern in Alkohol
↓
Durchtränken mit einem Intermedium
(Chloroform, Benzol od. Xylol)
↓
Durchtränken mit Paraffin
↓
Schneiden mit dem Mikrotom
↓
Aufkleben der Schnitte
(mit Eiweiß-Glyzerin)
↓
Befreien von der
Einbettungsmasse
↓
Überführung in
Wasser durch Alkohol
↓
Bleichen der Schnitte wenn
mit einer osmiumhaltigen
Fixierungsflüssigkeit behandelt
↓
Beizen
↓
Färben
↓
Differenzieren
↓
Überführen in Alkohol
↓
Durchtränken mit einem
Intermedium
(Karbol-Xylol od. Nelkenöl)
↓
Einschluß in Balsam

Zuhilfenahme der Wasserstrahlluftpumpe wird das notwendige rasche Eindringen der Fixierungsflüssigkeit am besten erreicht. Auf diese Weise gelingt es relativ rasch, das Objekt luftfrei zu machen und in wenigen Minuten zum Untersinken zu bringen. Zum Anschluß an die Pumpe werden die Gläschen mit einem durchbohrten Kautschukstopfen verschlossen. Durch die Bohrung ist ein zweckmäßig gebogenes Glasrohr geführt, an welches der Pumpenschlauch angeschlossen wird. Nach Öffnen des Wasserhahns sieht man alsbald aus den Schnittflächen der Objekte die Luft herausperlen. Nach kurzer Zeit wird die Evakuierung beendet. Um beim Schließen des Hahns ein Rücksaugen von Wasser in das Gefäß zu vermeiden, muß die Schlauchleitung mit einem sog. Rückschlagventil versehen sein. Es ist außerdem zweckmäßig, möglichst kleine Objekte zu fixieren, oder diese in so kleine Teile zu zerlegen, als die Untersuchung eben zuläßt. Auch ist ein Anschneiden vollständiger Organteile, z. B. Antheren, Fruchtknoten usw. stets zu empfehlen (mit scharfem Rasiermesser, nicht mit der Schere), was ebenfalls ein rasches Eindringen der Fixierungsflüssigkeit befördert. In manchen Fällen erscheint es auch zweckmäßig, das Fixierungsgefäß an einen warmen Ort zu stellen (auf den Thermostaten), da erfahrungsgemäß die Fixierungsgemische in der Wärme besser eindringen. Dagegen ist eine zu starke Erwärmung zu vermeiden wegen der Gefahr der Koagulation des Plasmas und Verquellung der Stärke.

Zur Technik der Fixierung mag noch gesagt sein, daß man für die Fixierungsflüssigkeit am zweckmäßigsten kleine zylindrische Gefäße von 55 mm Höhe und 23 mm Durchmesser verwendet, die mit einem Korkstopfen verschlossen werden können. Für Objekte, die im Laboratorium fixiert werden, verwende ich auch sog. Wägegläschen (45 mm Höhe — 25 mm Durchmesser oder 50 mm Höhe — 30 mm Durchmesser für größere Objekte), die mit ihrem Glasdeckelchen den Vorteil eines sehr sauberen Verschlusses haben, jedoch für den Transport nicht geeignet sind. In diesen Gefäßen können die Objekte sämtliche Flüssigkeiten bis zum Einbringen in das Paraffin durchlaufen. Ein unnötiger Wechsel von Gefäßen ist möglichst zu vermeiden, da sonst die Objekte leicht beschädigt werden. Nach vollzogener Fixierung versäume man nicht, dem Gläschen sofort[1]) einen Merkzettel beizugeben, auf dem mit Bleistift die Art des Objektes, die Fixierung und das Datum verzeichnet sind. Dieser Zettel kann mit einer Pinzette erfaßt werden und dient auch dazu, die Objekte schonend, ohne direkte Berührung, zu bewegen.

Bei Verwendung Flemmingscher Lösung darf der Zettel erst nach dem ... chen in das Gläschen geworfen werden, da sonst durch die Schwärzung des Osmiums die Schriftzüge unleserlich werden.

Fixierungs-Gemische.

Benennung	Zusammensetzung	Einwirkungs-dauer	Eignung
Alkohol-Eisessig Carnoy.	80 ccm absol. Alkohol 20 „ Eisessig	24 Stunden	Morphologisch-histologische und embryologische Untersuchungen
Zinkchlorid-Eisessig-Alkohol Juelsches Gemisch	2 g Zinkchlorid 2 ccm Eisessig 100 „ 50proz. Alkohol	24 Stunden	Morphologisch-anatomische Untersuchungen
Chrom-Osmium-Essigsäure Flemmingsche Lösung (schwächere)	180 ccm 1% Chromsäure 25 „ 2% Osmiumsäure 12 „ Eisessig 210 „ dest. Wasser	24—48 Stunden	zytologische Untersuchungen
Chrom-Osmium-Essigsäure Flemmingsche Lösung (stärkere)	15 ccm 1% Chromsäure 2 „ 2% Osmiumsäure 1 Eisessig 10 dest. Wasser	24—46 Stunden	embryologische und anatomische Untersuchungen
Fixierungsgemisch n. Regaud.	80 ccm 3% Kaliumdichromat 20 „ Käufl. Formol	4 Tage	zur Darstellung der Chondriosomen.

Fixiermittel: Man unterscheidet Einzelmittel und Gemische. In der Praxis werden weit bessere Resultate mit Fixierungsgemischen als mit Einzelmitteln erzielt, so daß die letzteren durch die ersteren fast vollständig verdrängt worden sind. Aus der großen Zahl der Fixierungsgemische sollen hier nur diejenigen zusammengestellt werden, die sich für die Untersuchung pflanzlicher Objekte besonders bewährt haben (s. Tabelle).

Auswaschen: Nach vollzogener Fixierung müssen die Objekte sorgfältig ausgewaschen werden, damit jede Spur von Fixierungsmittel entfernt wird. Der Zeitpunkt des Auswaschens wird von den verschiedenen Fixiermitteln verschieden schnell erreicht (vgl. hierzu die Angaben in der Tabelle der Fixierungsgemische). Das Waschmittel richtet sich nach der Natur der angewendeten Fixierungsflüssigkeit. Wäßrige

Fixierungsgemische werden mit Wasser ausgewaschen, alkoholische dagegen mit Alkohol. Die Konzentration des Waschalkohols richtet sich nach der Konzentration des Alkohols, der zur Herstellung des Fixierungsmittels verwendet worden war. Das Waschmittel muß in reichlichen Mengen vorhanden sein und oft gewechselt werden. Am einfachsten ist das Auswaschen unter einem entsprechend regulierten Wasserleitungsstrahl. Die Wasserzufuhr wird zweckmäßig so bemessen, daß die Objekte darin langsam kreisen, wodurch das Auswaschen sehr gefördert wird. Hierzu ist aber das die Objekte enthaltende Gläschen mit einer feinmaschigen Gaze zu überspannen, die durch einen Gummiring festgehalten wird. Die Dauer des Waschens sollte im allgemeinen eine Stunde nicht überschreiten.

Zum Auswaschen sehr kleiner Objekte eignet sich besonders das Fairchildsche Siebeimerchen.

Entwässern: Zum Zweck der Härtung und Einbettung in Paraffin müssen die Objekte zunächst entwässert werden. Die Entwässerung ist mit Alkohol[1]) vorzunehmen. Um jegliche Schrumpfungserscheinungen zu vermeiden, die durch plötzlichen Wasserentzug eintreten, wird der Alkoholgehalt nach und nach gesteigert. Das letzte Waschwasser wird sorgfältig abgegossen und durch 30proz. Alkohol ersetzt. Bei botanischen Objekten kann im allgemeinen mit 30proz. Alkohol begonnen werden, ohne daß diese Schaden nehmen. Erscheint bei sehr zarten Objekten besondere Vorsicht geboten, so beginne man mit 10proz. Alkohol. Sodann werden die Objekte in der gleichen Weise in 50-, 70-, 85-, 96proz. Alkohol übergeführt. In den einzelnen Stufen sind sie ca. 2 Stunden zu belassen, im 96proz. Alkohol dagegen etwa 24 Stunden und muß er während dieser Zeit einmal erneuert werden. Endlich wird das Objekt in 6—8 Stunden in absolutem Alkohol, der ebenfalls ein- bis zweimal zu erneuern ist, vollständig entwässert. Bei Objekten, die mit alkoholischen Fixierungsmitteln fixiert waren, fallen die ersten Stufen der Alkoholbehandlung weg. Man wäscht mit 70- oder 85proz. Alkohol aus und befördert sie über die nächsthöheren Stufen in absoluten Alkohol.

Totalfärbung der Objekte zur besseren Sichtbarkeit im Paraffinblock: Mit alkoholischen Fixierungsflüssigkeiten behandelte Objekte pflegen meist ganz farblos zu werden, so daß sie später im Paraffin schwer zu erkennen sind, was das Einbetten und namentlich das Orientieren auf dem Objektschlitten am Mikrotom wesentlich er-

[1]) Über eine selbsttätige Alkoholreihe s. O. Ranke, Zeitschr. wiss. Mikr. 1928, XLV, S. 46. — Über die Ausschaltung des absoluten Alkohols s. J. Zeitschr. wiss. Mikr., 1929, XLVI, S. 269.

schwert. In solchen Fällen ist es zweckmäßig, die Objekte bereits im Waschalkohol (70proz.) durch Eosin leicht anzufärben. Diese leichte Färbung genügt vollständig, um eine gute Sichtbarkeit derselben im Paraffin zu gewährleisten, ohne andererseits aber die endgültige histologische oder zytologische Färbung zu beeinträchtigen.

Durchtränken mit einem Intermedium: Im weiteren handelt es sich nun darum, das Objekt mit einem bei Zimmertemperatur festwerdenden Mittel zu durchtränken, damit es zum Schneiden auf dem Mikrotom die genügende Festigkeit bekommt. Das für pflanzliche Objekte zweckmäßigste Mittel ist das Paraffin. Aus den Objekten, die mit Paraffin durchtränkt werden sollen, muß zunächst der Alkohol durch eine andere, ebenfalls wasserfreie Flüssigkeit ersetzt werden, die sich einerseits mit Alkohol glatt mischt, andererseits ein gutes Lösungsmittel für Paraffin ist. Als solches Intermedium ist besonders Chloroform zu empfehlen; aber auch Xylol und Benzol lassen sich hierfür verwenden. Die Objekte dürfen jedoch nicht sofort in das Intermedium übertragen werden, da sonst starke Diffusionsströmungen auftreten, die Schrumpfungen und sogar Zerreißungen herbeiführen können. Es ist deshalb unbedingt notwendig, hier Zwischenstufen einzuschalten. In den meisten Fällen wird es genügen, die Objekte auf ein bis zwei Tage in ein Gemisch von absolutem Alkohol und Chloroform zu gleichen Teilen zu bringen, sodann auf ebenso lange Zeit in reines Chloroform. Bei sehr empfindlichen Objekten ist die Einschaltung von zwei oder sogar drei Zwischenstufen zu empfehlen.

2 Teile Alkohol und 1 Teil Chloroform,
1   2
reines Chloroform, oder
3 Teile Alkohol und 1 Teil Chloroform,
" 2 "
" 3 "
reines Chloroform.

Die Zeit, während welcher die Objekte in den einzelnen Stufen zu verweilen haben, ist ungefähr auf 12 Stunden zu bemessen.

In derselben Weise wäre auch bei der Verwendung der anderen oben angegebenen Intermedien vorzugehen.

Während in den Zwischenstufen meistens ein Untersinken der Objekte zu beobachten ist, schwimmen diese in reinem Chloroform.

Anstelle der üblichen Alkoholreihe, die der Einbettung vorangeht, verwendet Mlle. Larbaud[1]) folgende Gemische:

---

[1]) Mlle. Larbaud, Nouvelle technique pour les inclusions et les préparations microscopiques des tissus végétaux et animaux Compt. rend. Acad. sciences Paris, 1921, CLXII, S. 1317.

100 ccm eines Gemisches gleicher Teile 95proz. Aethyl- und n-Butylalkohol und 1. + 225 ccm Wasser (Alkohol von 30°), 2. 62,5 ccm (Alkohol von 60°), 3. 21,87 ccm (Alkohol von 80°), 4. 2,63 ccm (Alkohol von 95°). Dann kommt reiner n-Butylalkohol, ferner eine Lösung von ein wenig Paraffin in n-Butylalkohol, ferner eine Lösung von ein wenig Paraffin in n-Butylalkohol. Die Bäder mit Xylol oder Toluol fallen weg.

Durchtränken mit Paraffin: Die mit dem Intermedium durchtränkten Objekte werden nunmehr samt der Flüssigkeit in ein vorgewärmtes Porzellangefäß[1]) geschüttet. Dieses wird sodann bis zum Rande mit kleinen Paraffinstücken (mit einem Messer feingeschabtes Paraffin) aufgefüllt. Die so beschickten Schälchen werden in den Wärmeschrank überführt, dessen Temperatur wenigstens um 3 Grad höher liegen muß, als der Schmelzpunkt des zur Verwendung gelangten Paraffins.

Um die Überführung in Paraffin möglichst schonend vorzunehmen, ist es zweckmäßig, den Gläschen, die das Intermedium und Objekt enthalten, zunächst nur einzelne kleine Paraffinbrocken zuzugeben, abzuwarten, bis diese sich bei Zimmertemperatur gelöst haben, sodann die Gläschen auf den Wärmeschrank zu stellen und weitere Paraffinspäne beizufügen. Nachdem alles geschmolzen ist und die Objekte auch untergesunken sind, schüttet man den gesamten Inhalt in der oben angegebenen Weise in ein vorgewärmtes Prozellangefäß.

Je nach der Härte der Objekte verwendet man Paraffin von verschiedenem Schmelzpunkt. Für unsere Zwecke kommt namentlich solches von 52° in Betracht. Sehr wichtig ist, daß für mikrotechnische Arbeiten geeignetes, namentlich gut gereinigtes Paraffinmaterial[2]) verwendet wird.

Neues Paraffin schneidet sich im allgemeinen schlechter als schon gebrauchtes. Es ist daher zu empfehlen, stets einen gewissen Vorrat geschmolzenen Paraffins in einem Porzellantiegel im Wärmeschrank bereit zu halten.

Die Objekte müssen unbedingt so lange im Thermostaten verweilen, bis sich das Intermedium vollständig verflüchtigt hat. Um dies zu beschleunigen, ist es zweckmäßig, jeden Tag ein- bis zweimal mit einer Pinzette den oben bereits erwähnten Merkzettel zu erfassen und damit das flüssige Paraffin umzurühren. Ist regelmäßig gerührt, so ist nach 3—4 Tagen das Intermedium verdunstet. Zur Vorsicht läßt man dann die Objekte noch 1—2 Tage im Wärmeschrank, namentlich, wenn es sich um große Stücke handelt.

[1]) Porzellangefäße von 37 mm Höhe und 33 mm Durchmesser.

[2]) Am besten zu beziehen bei Dr. G. Grübler u. Co., Leipzig oder Dr. K. Holborn, Leipzig.

Wärmeschrank: Auf die nähere Beschreibung und Handhabung des bereits mehrfach erwähnten Wärmeschrankes soll hier nicht eingegangen werden. Wir verweisen nur auf die Spezialkataloge einiger Firmen, die dieses Hilfsgerät in verschiedenen, z. T. sehr vollkommenen Ausführungen herstellen, woselbst auch Gebrauchsanweisungen zu finden sind:

Leitz, Wetzlar; R. Jung, Heidelberg; Sartorius, Göttingen; Reichert, Wien u. a. m.

Einbetten in Paraffin. Ist das Paraffin vollständig in das Objekt eingedrungen und das Intermedium ganz verflüchtigt, so kann das Einbetten vorgenommen werden.

Hierzu sind die folgenden Vorkehrungen zu treffen. Es sind bereit zu stellen die Einbettungsgefäße, eine geräumige Schale mit kaltem Wasser, ein Bunsenbrenner, eine Heizlampe und eine Pinzette oder Präpariernadel (mit stumpfer Spitze zur Vermeidung von Objektbeschädigungen).

Als Einbettungsgefäße benutzt man am besten viereckige Porzellanschälchen[1]) von 4—5 cm Grundfläche und ca. 1 cm Tiefe. Um ein glattes Loslösen des Paraffins zu sichern, verreibt man einen Tropfen Glyzerin gründlich im Schälchen. In gewissen Fällen erweisen sich für diesen Zweck auch die sog. Einbettrahmen aus Messing oder Glas als nützlich. Ebenso Einbettkästchen aus Stanniol, die sich in jeder gewünschten Größe, durch Zusammenfalten dicker Stanniolfolien über rechteckigen Holzklötzchen von entsprechender Größe herstellen lassen.

Das Einbetten geschieht nun in der Weise, daß der Inhalt des Paraffintöpfchens rasch in das Einbettungsschälchen ausgegossen wird. Die Objekte sind hierauf mit einer angewärmten Nadel oder Pinzette zu orientieren und in Reihen zu ordnen, damit sich später der Block ohne Beschädigung derselben zerlegen läßt. Haben die einzelnen Objekte die gewünschte Anordnung und Orientierung erhalten, so ist das Paraffin rasch zum Erstarren zu bringen. Nachdem zuerst durch leichtes Anblasen sich ein dünnes Häutchen gebildet hat, wird das Gefäß vorsichtig in eine Schale kalten Wassers getaucht, sodann unter der fließenden Wasserleitung weiter gekühlt, wo sich der Paraffinblock meist rasch aus dem Schälchen löst. Andernfalls fährt man mit einem dünnen Messer zwischen Paraffin und Schalenrand entlang, wodurch der Block herausgedrückt wird.

Als sparsames Verfahren der Übertragung in Paraffin empfiehlt H. Schneider folgendes: Ein Glastubus wird durch 3 Teilstriche in 4 gleiche Teile geteilt. Man füllt ihn zu $^3/_4$ mit absolutem Alkohol,

[1]) Zu beziehen durch die Firma Gerhard in Bonn a. Rh.

bringt die Objekte hinein, gießt Benzol auf und schüttelt gut durch. Nach etwa 12 Stunden schüttet man 1/4 des Gemisches ab, ersetzt es durch Benzol und schüttelt wieder. In gleichen Abständen schüttet man 1/2 und 3/4 des jeweiligen Gemisches ab und füllt mit Benzol auf; dann gibt man reines Benzol auf die Objekte.

Nach Schneider ist die Paraffin-Methode der Öl-Gelatine-Methode bei pflanzlichen Objekten sehr überlegen. Letztere Methode[1]) ist die beste für Objekte die vor dem Schneiden nicht entwässert werden können.

Das Ordnen und Orientieren ist eine etwas kniffelige Arbeit, die rasch, bevor das Paraffin erstarrt, ausgeführt werden muß. Um das Erstarren des Paraffins zu verzögern, damit das Richten der Objekte mit mehr Ruhe geschehen kann, kommen sog. Einbettrommeln und Wärmebänke zur Verwendung, Apparate die sehr nützlich sind.

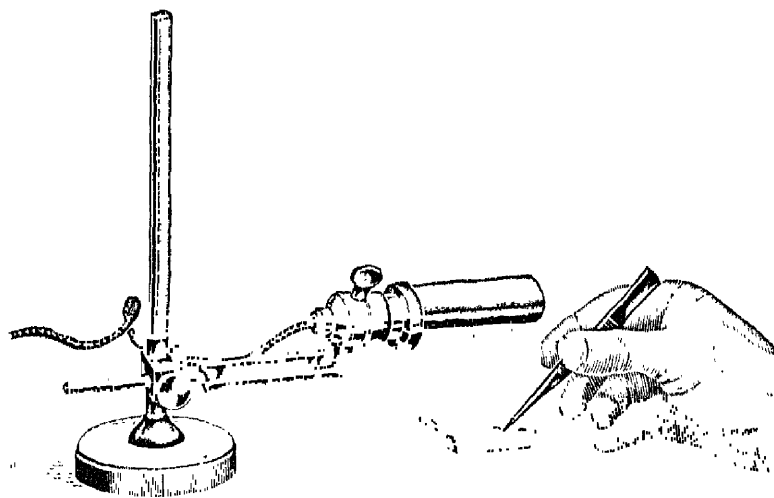



Fig. C. Heizlampe nach v. Büren in geeigneter Stellung zur Vornahme von Paraffineinbettungen

Ich selber gebrauche zu diesem Zweck bereits seit mehreren Jahren mit sehr gutem Erfolg eine Heizlampe[2]), die ich mir in folgender Weise habe zusammenstellen lassen. Der Lampenhalter ist an einem Stativ vertikal verschiebbar. Außerdem ist dieser Halter mit zwei besonders ausgebildeten Kugelgelenken versehen, die es gestatten, die kleine elektrische Lampe (Lampe, wie sie heute vielfach an Nähmaschinen, Führerständen usw. Verwendung findet), mit Abblendungsschirm in jede gewünschte Lage zu bringen.

Beim Einbetten wird der Halter so gestellt, daß die Lampe einige Zentimeter über dem Einbettungsschälchen zu liegen kommt, so daß durch die Wärmeausstrahlung die Erstarrung des Paraffins in der ge-

[1]) Apathy, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1912, XXIX, S. 449.

[2]) Zu beziehen durch die Optische Werkstätte E. F. Büchi Söhne, Bern.

wünschten Weise verzögert wird. Außerdem ist das Operationsfeld in bester Beleuchtung, ohne irgendwelche Blendung. Eine doppelte Lage von Filtrierpapier verhindert eine zu starke Abkühlung des Bodens des Einbettungsgefäßes.

Der Einbettungsmethode in Zelloidin[1]) sowie der Gefriermethode[2]) kommen für frische pflanzliche Objekte eine untergeordnete Bedeutung zu. Drogen können in durch Wasser aufgeweichtem Zustand mit dem Gefriermikrotom geschnitten werden.

Zur Einbettung mit Zelloidin geht J. Kisser folgendermaßen vor[3]). Er gibt die Gegenstände in 2-, 4- und 8proz. Lösung (in einem Gemisch gleicher Teile Weingeist und Äther), läßt einen Tag oder länger (bei schlecht durchdringbaren Objekten) einweichen, nachdem Fruchtknoten, Blatt- und Blütenknospen u. dgl. vorher angestochen wurden. Öfteres Schütteln oder gelinde ständige Bewegung ist zu empfehlen. Nach dem Eindicken härtet man die Zelloidinblöcke in 70- bis 80proz. Weingeist. Geschnitten wird unter starker Befeuchtung von Messer und Objekt mit 70proz. Weingeist, wobei der Schnittwinkel möglichst klein gewählt wird. Das Zelloidin kann mit Gentianaviolett und Kernschwarz gefärbt und in den Schnitten — in deren Interzellularen es eindringt — nach Belieben belassen oder daraus herausgelöst werden. Einschließen in wässrige Mittel oder venezianischen Terpentin, in den die Schnitte direkt aus hochprozentigem Weingeist übertragen werden können.

Für Weiteres sei auf die Literatur verwiesen:

Kisser, J., Leitfaden der botanischen Mikrotechnik, Jena 1926, S. 57—60.

Kisser, J.,Der heutige Stand botanisch-mikrotechnischer Schneidemethoden. Biologia Generalis, 1928, IV, S. 155—158.

Mikrotom. Auf die nähere Beschreibung der zahlreichen Mikrotomkonstruktionen soll hier nicht näher eingegangen werden. Es sei an dieser Stelle nur auf die Kataloge und Beschreibungen der Firmen hin-

[1]) Becher, S., Anleitung zum Gebrauch des Mikrotoms sowie zur Vorbehandlung der Objekte (Einbetten) und zur Nachbehandlung der Schnitte. Herausgegeben von den optischen Werken E. Leitz, Wetzlar, 2. Aufl., sine anno, S. 14—16 und 34—37.

[2]) Becher, S., l. c. S. 37—40. — Kisser, J., 1926, l. c. S. 54—55. — Kisser, J., 1928, l. c. 158—160. — Kisser, J., Die Verwendungsmöglichkeit der Gefriermethode bei pflanzlichen Objekten. Zeitschr. f. wiss. Mikr., 45, 1929, S. 433—441.

[3]) J. Kisser, Die Bedeutung der Zelloidinmethode als Hilfsmittel für die pflanzliche Histologie. Zeitschr. wiss. Mikr., 1926, XLIII, S. 374.

gewiesen, die sich mit der Herstellung dieser Instrumente befassen. R. Jung, Heidelberg; Leitz[1]), Wetzlar; Reichert, Wien u. a. m.

Man unterscheidet zwischen Universal-Mikrotomen und Spezial-Mikrotomen, den ersteren kommt eine allgemeine Anwendungsmöglichkeit zu, während die letzteren nur einem speziellen Zweck dienen.

Wer ein Mikrotom anschaffen oder sich mit der Handhabung desselben vertraut machen will, dem sei dringend empfohlen, sich an einen Fachmann oder an ein Universitäts-Institut zu wenden, wo er in kurzer Zeit in nützlicher Weise über diese Dinge unterrichtet wird. Eine Orientierung allein an Hand der einschlägigen Literatur ist mühsam und führt meist nicht zum gewünschten Ziel. Eine sehr gute Orientierung über die verschiedenen Mikrotomsysteme, sowie eine Anleitung zu ihrer Handhabung findet man bei J. Kisser[2]).

Herstellen der Schnitte. Sind die Objekte zu mehreren in einem Paraffinblock eingebettet, was meist der Fall sein wird, so muß zunächst die Paraffintafel in kleine Blöcke zerlegt werden, von denen jeder ein Objekt enthält. Um dieselben sicher zu trennen, werden mit einem scharfen Skalpell Furchen zwischen diese hindurch gezogen, die es gestatten, die einzelnen Stücke auseinander zu brechen; der Bruch wird stets der eingerissenen Furche folgen. So gewinnt man die einzelnen Objekte in Paraffinprismen für sich. Diese werden nun mit einem heißen Spatel fest auf ein Holzklötzchen[3]) geschmolzen. Sobald das Paraffin erstarrt, kommt das Klötzchen samt dem aufsitzenden Objekt in eine Schale kalten Wassers. Die Bleieinlage sichert das Untertauchen des Paraffinblockes, so daß derselbe bereits nach wenigen Minuten so weit erhärtet ist, daß mit dem Schneiden begonnen werden kann.

Beim Aufkleben der Blöcke ist gleichzeitig auf eine gewisse Orientierung zu achten. Zur Herstellung von Querschnitten ist das Objekt so aufzusetzen, daß seine Längsachse senkrecht zur Messerschneide orientiert ist. Bei Längsschnitten dagegen muß das Objekt parallel zur Schneide des Messers gestellt werden, also auch parallel zur oberen Fläche des Holzklötzchens.

Der in der oben beschriebenen Weise aufgeklebte Paraffinblock wird nun mit einem feinen, scharfen Skalpell zugeschnitten. Zur Erzielung von geraden Schnittbändern ist darauf zu achten, daß die gegen-

[1]) Becher, S., Über neue Mikrotomkonstruktionen, Zeitschr. f. wiss. Mikr., XXX, 1913, S. 192–202.

[2]) Kisser, J., Der heutige Stand botan.-mikrotechn. Schneidemethoden. Biologia Generalis, IV, 1928, S. 133–138.

[3]) Am besten gelangen hier Buchenholzklötzchen von 25 mm Höhe, 20 mm Breite, 10 mm Dicke mit eingegossener Bleieinlage zur Verwendung

überliegenden Kanten des Blockes vollkommen parallel zueinander sind. Die Oberfläche des Blockes (Schnittfläche) muß also rechteckig oder quadratisch sein. Das Holzklötzchen wird nun im Objekthalter des Mikrotomes festgeklemmt und das Objekt vermittelst der verschiedenen Schrauben in die endgültige gewünschte Lage zum Messer gebracht. Zum Schneiden wird das Messer quergestellt.[1]) Der Paraffinblock muß so orientiert werden, daß die dem Messer zugewendete Kante vollständig parallel zur Schneide liegt. Unter diesen Verhältnissen wird es meist

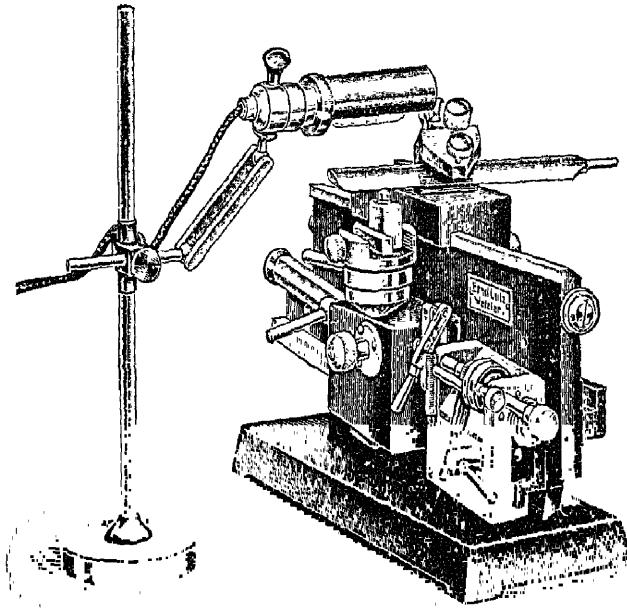



Fig. D. Anwendung der Heizlampe nach v. Büren beim Mikrotomieren

gelingen, den Block in zusammenhängende lückenlose Schnittserien zu zerlegen.

In manchen Fällen werden beim Schneiden die folgenden Störungen eintreten; die Schnitte rollen sich, die Schnitte wellen sich oder endlich die einzelnen Schnitte haften nicht aneinander. Die Hauptursache wird meistens hartes oder zu kühles Paraffin sein. Durch eine gelinde Erwärmung von Paraffin und Messer, sowie der gesamten, das Mikrotom umgebenden Luft können diese Übelstände rasch beseitigt werden, sofern im Übrigen alle Bedingungen für das gute Gelingen der Schnittserien erfüllt sind. (Reines Paraffin, vollständig verdunstetes Intermedium und namentlich ein gut gepflegtes Messer.) Für die gewünschte

[1]) Bezüglich der Winkelverhältnisse der Mikrotommesser vgl. J. Kisser, Der heutige Stand botanisch-mikrotechnischer Schneidemethoden. Biologia Generalis, IV, 1928, S. 138—146.

zweckmäßige Erwärmung von Paraffin, Messer und Mikrotom kann ich auch hier wiederum die bereits oben besprochene Heizlampe sehr empfehlen.

Andererseits kann es auch vorkommen, daß sich die Schnitte stauen und an der Messerklinge kleben bleiben. In diesem Fall muß der Paraffinblock, eventuell auch das Messer, in kaltem Wasser gekühlt werden.

Eine gewisse Sorgfalt und Aufmerksamkeit erfordert auch das Abheben der Schnittbänder vom Messer. Sobald das Band eine gewisse Länge erreicht hat, wird es mit einem Pinsel an seinem freien Ende hochgehoben, und gleichzeitig das am Messer haftende Ende mit einem feinen Skalpell unterfahren. Das auf diese Weise abgehobene Paraffinband wird nun sogleich auf ein sauberes, namentlich glattes und staubfreies Papierblatt gelegt. Hier zerlegt man die Paraffinbänder in kürzere

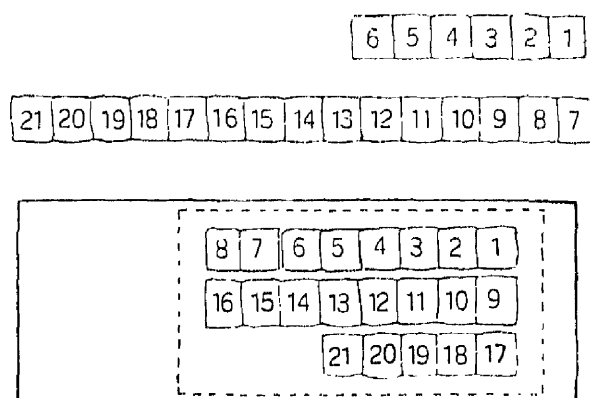



Fig. E. Zerlegen und Aufkleben der S

Teilbänder, damit sie von den in Aussicht genommenen Deckgläsern[1]) später gut bedeckt werden. Beim Zerlegen der Schnittbänder, wie auch beim Aufkleben der Teilbänder, ist dafür zu sorgen, daß sie nicht durcheinander gebracht werden. Um das Einhalten der richtigen Reihenfolge beim Aufkleben zu gewährleisten, wird am besten nach dem in Fig. E gegebenen Schema verfahren. Bei der Wahl der hier zur Verwendung kommenden Objektträger ist auf vollständig schlieren- und luftblasenfreies Glas zu achten. Vor dem Gebrauch sind diese gründlich zu reinigen, besonders neue Gläser sind vom sog. Hüttenrauch zu befreien. Nach meiner Erfahrung wird dies am besten durch Einlegen in 1 proz. Chromsäure und nachfolgendem gründlichen Abspülen in fließendem Wasser erreicht. In der gleichen Weise ist auch mit den Deckgläsern zu verfahren.

[1]) Am zweckmäßig t man für
32 mm oder 25 × 45 mm.

Das **Aufkleben der Schnitte** geschieht am besten mit Eiweiß-Glyzerin (Hühnereiweiß mit der gleichen Raummenge reinen Glyzerins vermischt, dem etwas Thymol zur besseren Haltbarkeit beigefügt wird). Mit einem feinen Glasstab wird ein kleiner Tropfen Eiweiß-Glyzerin auf den Objektträger aufgetragen und gründlich verrieben, so daß die ganze Glasfläche mit einer gleichmäßig dünnen Schicht überzogen ist. Auf den gut bestrichenen Objektträger wird nun mit einer Pipette reichlich destilliertes Wasser gebracht, dann die einzelnen Teilbänder mit einem Skalpell in der richtigen Reihenfolge aufgelegt. Dabei ist zu beachten, daß die Unterseite der Bänder glänzend, die Oberseite matt ist. Auf dem feuchten Objektträger müssen sich die Schnitte vollständig strecken und glätten, um dies zu befördern, erwärmt man denselben vorsichtig auf einer Spiritusflamme, ein Schmelzen des Paraffins darf allerdings dabei nicht eintreten. Einige Minuten, nachdem das überschüssige Wasser abgelaufen ist, bringt man die Objektträger in den Wärmeschrank, wo sie am besten auf die Einbettschälchen zu legen sind. Dort wird das Paraffin schmelzen und gleichzeitig auch das Eiweiß koagulieren. Die Präparate bleiben mindestens 3 Stunden im Thermostaten. Hierauf werden sie auf eine kühle staubfreie Unterlage gebracht, woselbst das Paraffin sofort erstarrt. In diesem Zustand lassen sich die Präparate beliebig lang bis zur Weiterbehandlung aufbewahren.

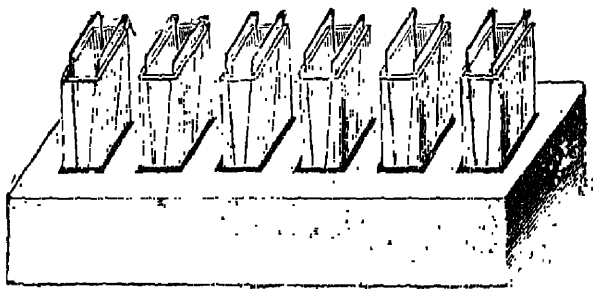
Vorbereitung zur Färbung. Vor dem Färben müssen die Schnitte durch Xylol vom Paraffin befreit werden. Nach einigen Minuten wird das Paraffin vollständig gelöst sein, und die Präparate können über absoluten Alkohol in Wasser übergeführt werden. Liegen Präparate vor, die durch osmiumhaltige Fixierungsflüssigkeiten geschwärzte Schnitte enthalten, so muß diese Schwärzung nunmehr entfernt werden, da sonst die spätere Färbung beeinträchtigt werden könnte. Die Bleichung der Schnitte geschieht am besten durch Behandlung der Präparate mit 3proz. Wasserstoffsuperoxyd (H_2O_2) während einiger Stunden. Hierauf werden sie etwa 5—10 Minuten lang in fließendem Wasser gewaschen.

Färbung. Man unterscheidet zwei Arten von Färbungen, histologische Färbung und zytologische Färbung. Bei der ersteren handelt es sich darum, verschiedene Gewebebestandteile von einander abzuheben, während die zytologische dazu dient, die einzelnen Bestandteile der Zelle zu unterscheiden und sichtbar zu machen.

Von den sehr zahlreichen Färbungsverfahren, die für zytologische Zwecke empfohlen werden, sollen hier nur zwei eingehender besprochen werden. Diese haben sich nach unseren Erfahrungen für botanische Objekte besonders bewährt.

1. Eisen-Haematoxylinfärbung nach Heidenhain. Zur Herstellung der Farbstofflösung ist eine 10proz. Lösung von Haematoxylin pur.[1]) in absolutem Alkohol vorrätig zu halten. (Stammlösung, die mindestens vier Wochen im Dunkeln reifen muß.) Diese ist zum Gebrauch mit 9 Teilen destilliertem Wasser zu verdünnen.

Beispiel: 8 ccm Stammlösung + 72 ccm Aq. dest. ergeben die nötige Menge, um ein für Färbungen übliches Zylinderglas[2]) zu füllen.

Da das Haematoxylin ein sog. Beizenfarbstoff ist, benötigen wir noch eine Beizenflüssigkeit, die aus einer 3proz. wäßrigen Eisenalaunlösung besteht. Die Färbung wird in folgender Weise vollzogen. Die von Paraffin befreiten und eventuell gebleichten Schnitte kommen in eine Eisenalaunlösung, wo sie mindestens 2 Stunden verweilen. Hierauf werden die Präparate rasch in einem Wasserglas unter der fließenden Wasserleitung gespült. Dann kommen die Objektträger weiter in die Haematoxylinlösung, wo sie ebenfalls mindestens zwei Stunden verbleiben müssen, um nachher gründlich in Wasser gespült zu werden.

ekasten im Holzblock

Die Schnitte erscheinen jetzt tiefschwarz und lassen unter dem Mikroskop keinerlei Details erkennen, sie sind überfärbt und es muß ihnen deshalb soviel Farbstoff entzogen werden, bis die Struktureinzelheiten der Zellen deutlich sichtbar sind und sich voneinander abheben (regressive Färbung). Zu diesem Zweck sind die Präparate abermals in die wäßrige 3proz. Eisenalaunlösung zu bringen (anderes Gefäß als zum Beizen!). Nachdem die Kontrolle unter dem Mikroskop ergeben hat, daß der genügende Grad der Differenzierung erreicht ist, werden die Präparate 10—15 Minuten im fließenden Leitungswasser gespült. Das Differenzieren ist hierbei das Schwierigste, davon hängt aber auch der Ausfall der Färbung ab. Das Präparat wird jetzt mit 96proz. und absolutem Alkohol entwässert und über Karbol-Xylol (3 Teile Xylol + 1 Teil kristallisierte Karbolsäure), Xylol oder Nelkenöl in Kanadabalsam gebracht.

[1]) Bei der Anschaffung von Farbstoffen ist auf gute, namentlich reine Fabrikate zu achten. Wir empfehlen besonders die Firma Dr. G. Grübler u. Co., Leipzig.

[2]) Zylindergefäße mit eingeschliffenem Deckel sind von der Firma Vogel in Gießen zu beziehen.

In den meisten Fällen wird es aber wünschenswert erscheinen, noch eine Nachfärbung[1]) vorzunehmen, um die Membranen zu tingieren. Zu diesem Zweck wird das Präparat vom absoluten Alkohol auf einige Minuten in eine gesättigte alkoholische Lösung von Congocorint gebracht, worauf der überschüssige Farbstoff mit absolutem Alkohol kurz abgespült wird. Durch diese Behandlung wird eine rote, sehr haltbare Färbung erzielt. Die Überführung in Kanadabalsam findet in der oben angegebenen Weise statt.

2. Safranin-Gentianaviolett-Orange G. (Flemmingsche Dreifachfärbung). Es handelt sich hier um eine Mehrfachfärbung, bei welcher die einzelnen Farbstoffe nicht gemischt, sondern nacheinander dargeboten werden. Sie ergibt ganz besonders gute Resultate an Objekten, die mit Flemmingscher Lösung oder anderen ähnlichen chromsäurehaltigen Flüssigkeiten fixiert worden sind. Die Färbung wird folgendermaßen vollzogen. Die Präparate gelangen auf 6—8 Stunden in die Safraninlösung (2 g Safranin in 100 ccm 50proz. Alkohol gelöst). Die Differenzierung erfolgt mit schwachem Säure-Alkohol und muß so weit getrieben werden, bis der Kern und sein Gerüst klar zu erkennen sind. (Kontrolle unter dem Mikroskop.) Der Differenzierungsprozeß wird durch energisches Ausspülen mit 96 proz. Alkohol unterbrochen. Zur Überführung in Gentianaviolett (1proz. wäßrige Lösung) muß der Alkohol durch Wasser verdrängt werden. Die Einwirkungsdauer des Gentianaviolettes beträgt 2—10 Minuten, sie muß für jedes einzelne Objekt ausprobiert werden. Hierauf wird der überschüssige Farbstoff in Wasser ausgespült. Die nun folgende Behandlung mit Orange G.-Lösung (auf 100 ccm destillierten Wassers 0,1 g Orange G.) wird am besten auf dem Objektträger vorgenommen. Das Orange darf höchstens 2 Minuten einwirken (der richtige Färbungsgrad muß für jedes Objekt ausprobiert werden). Hierauf sind die Schnitte in Wasser zu waschen und diese Waschung ist in absolutem Alkohol und Nelkenöl solange fortzusetzen, bis keine Farbstoffwolken mehr aus den Schnitten entweichen. Nach der Behandlung mit Nelkenöl können die Präparate direkt in Kanadabalsam gelangen. Die Färbung ist dann gut ausgefallen, wenn die Nukleolen und die Chromosomen in sich teilenden Zellen leuchtend-rot, die Spindelfasern bläulich erscheinen, und das Plasma einen gelblich-braunen Ton angenommen hat.

Die sichere Handhabung dieser Färbung erfordert ziemlich viel Übung. Namentlich sind für jedes Objekt die Dauer der Einwirkung

---

[1]) Die Nachfärbung, sowie die Überführung der Präparate aus Alkohol über Karbol-Xylol und Xylol zwecks Einschließung in Kanadabalsam wird am besten in rechteckigen Glaskästen von Objektsträgerhöhe vorgenommen, die in einem Holzblock stehen.

der einzelnen Farbstoffe, sowie der Auswaschungen auszuprobieren, da sie je nach der Art seiner Fixierung sehr verschieden ausfallen kann. Die histologische Färbung läuft auf botanischem Gebiet im wesentlichen auf Membranfärbungen hinaus. Diese Färbungen leisten, ohne für bestimmte Wandstoffe spezifisch zu sein, dann gute Dienste, wenn es sich darum handelt, einzelne Elemente gegeneinander abzuheben und so Kontrastwirkungen zu erreichen. Solche Präparate zeichnen sich dann auch durch besondere Übersichtlichkeit aus.

So verwenden wir für histologische Zwecke besonders gerne Mehrfachfärbungen, welche sich auch für Einzelschnitte, die von Hand ausgeführt worden sind, vorzüglich eignen.

Es erweist sich als vorteilhaft bei den Mehrfachfärbungen zuerst die verholzten Membranen zu färben, sodann diese eventuell zu differenzieren, und erst dann die Färbung der unverholzten Elemente vorzunehmen. Zum Beispiel ist bei der Kombination Safraninhaemalaun[1]) (Böhmer) das Präparat oder der Schnitt zuerst auf ca. 1 Stunde in Safranin zu bringen und mit Säure-Alkohol zu differenzieren, bis nur noch die verholzten Membranen gefärbt erscheinen. Hierauf folgt eine kurze Behandlung mit Haemalaun und nachfolgender Bläuung im Leitungswasser, um auch die unverholzten Wände zu tingieren. Eine andere, sehr brauchbare Kombination ist Safranin-Kernschwarz, ferner auch Gentianaviolett-Eosin.

Bechersche Beizenfarbstoffe. Auch die in neuerer Zeit von Becher[2]) empfohlenen Echtfärbungen mit künstlichen Beizenfarbstoffen sind mit Vorteil für pflanzliche Objekte zur Anwendung gekommen. Wir verweisen hier auf die diesbezüglichen interessanten Mitteilungen von J. Kisser[3]) und G. Jamaha[4]).

---

[1]) Zu einer Herstellung werden 2 Lösungen angesetzt. I. 1 g Haematoxylin pur. + 10 ccm Alkohol absol. im geschlossenen Reagenzglas. II. 20 g Alaun + 200 ccm warmes destilliertes Wasser. Nach 24 Stunden werden die beiden Lösungen zusammengegossen; sodann gedeckt (aber mit genug. .. ...
12—14 Tagen ausgesetzt. Beim Abfüllen in eine gutschließende Flasche wird filtriert.

[2]) Becher, S., Untersuchungen über Echtfärbungen der Zellkerne mit künstlichen Beizenfarbstoffen und die Theorie des histologischen Färbeprozesses mit gelösten Lacken. Berlin 1921.

[3]) Kisser, J., Über die Brauchbarkeit Bechers neuer Kernfärbungen nach Beobachtungen an pflanzlichen Objekten. Zeitschr. f. wiss. Mikr. u. f. mikr. Technik, 40, 1923, S. 115—141. — Kisser, J., Ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der Becherschen Färbungen. Zeitschr. f. wiss. Mikr. u. f. mikr. Technik, 41, 1924, S. 80—88. — Kisser, J., Über einige weitere Bechersche Kernfärbungen, Zeitschr. f. wiss. Mikr. u. f. mikr. Technik, 41, 1924, S. 369—373.

[4]) Jamaha, G., Über die Anwendung der Becherschen Beizenfarbstoffe auf die Pflanzenkaryologie. The Botanical Magaz. Tokyo, XXXVIII, 1924, S. 61—75.

Allgemeines über Färbungen

Das Färben spielt in der Mikrochemie der Pflanzen eine so große Rolle, daß auf einige allgemeine Gesichtspunkte hingewiesen werden muß. Von einer Besprechung der Färbetheorien, die zwischen Adsorption und fester chemischer Bindung[1]) schwanken, sei abgesehen. Wahrscheinlich hat Michaelis[2]) Recht mit der Ansicht, daß es keine einheitliche Färbungstheorie geben kann, weil je nach Farbstoff und Substrat eine Reihe verschiedener Vorgänge eintritt.

Vielfach wird die Ansicht vertreten, daß die Anilinfarben mit den Eiweißkörpern chemische Verbindungen eingehen, daß Verbindungen der Farbsäuren entstehen, zumal Heidenhain (Zeitschr. wiss. Mikr. 1902, Arch. ges. Phys., 1902 u. a.) gefunden hatte, daß Eiweiß sowohl in Lösung als auch in fester Form sich mit Farbsäuren und Farbbasen in der Farbe der betreffenden Farbsalze färbt. Von Michaelis (Pflüg. Arch., 1903) wurde aber darauf hingewiesen, daß Zellulose sich in dieser Hinsicht ebenso verhält und von anderer Seit wird die Färbung als ein rein physikalischer Vorgang betrachtet. Besonders A. Fischer (Fix., Färb. u. Bau d. Pl., 1899) hat die Färbung auf physikalische Prozesse zurückgeführt, ihm haben sich u. a. Miehe (Flora, 1903, LXXXVIII. 105) und Arnoldi angeschlossen. Die physikalischen Eigenschaften eines Körpers stehen indessen mit seiner chemischen Konstitution in nahem Zusammenhang.

Nach Keller[3]) werden die mikroskopischen Färbungen an lebenden Zellen am stärksten von den elektrischen Kräften beeinflußt, daneben von dem Dispersitätsgrad der angewandten Reagentien, von deren Molekulargröße, wahrscheinlich auch von Adsorptionserscheinungen und chemischen Kräften. Die Beteiligung elektrischer Kräfte ist bewiesen, seit Péterfi tierische und pflanzliche Präparate mit dem Kapillar-Elektrometer und dem Binanten-Elektrometer gemessen hat.

Zur Bestimmung des Wanderungssinns der Farbstofflösungen benutzt Keller frische Querschnitte durch den Stengel klimmender Stammstücke des Efeus.

[1]) Vertreter einer chemischen Theorie der Färbung sind in neuerer Zeit u. a. P. Pfeiffer u. F. Wittka, Chem. Ztg., 1916, XL, S. 357.

[2]) L. Michaelis, Der heutige Stand der allgemeinen Theorie der histologischen Färbung, Arch. f. mikr. Anat., 1920, XCIV; vgl. auch J. Traube, Zur Theorie der Färbung, Ber. deutsch. chem. Gesellsch., 1915, XLVIII, S. 938.

[3]) R. Keller, Die Elektrizität in der Zelle, 2. Aufl., 1925 (Verlag J. Kittls Nachfolger Keller u. Co., Mährisch-Ostrau. Eine Liste solcher Färbungen bei Keller, S. 305.

+ (Anodisch)	— (Kathodisch)
Kutikula	Epidermis
Merenchym der Rinde	Rindenparenchym
Holzteil	Siebteil
	Kambium (am stärksten negativ)
	Mark.

Man kann also, wenn man die anodischen und kathodischen Färbungen von Farbstoffen[1]) kennt, die Anoden und Kathoden-Orte der Gewebe ermitteln.

Etwas ähnliches bedeuten wohl die — ausschließlich an tierischem Material — festgestellten Sauerstoff- und Reduktionsorte von Unna[2]).

Nach Keller ist auch die übliche Einteilung der Farbstoffe in saure und basische verfehlt, nach ihm ist vielmehr die Elektropolarität der Farbstoffe in den weitaus meisten Fällen keine feste konstitutive Funktion, sondern hängt von zahlreichen Nebenumständen ab, unter anderem von der gröberen oder feineren Dispersion und sogar von der Konzentration. Bei den kolloiden Farbstoffen bestimmt bei einer gewissen Größe der Moleküle die Oberflächenladung den Wanderungssinn und nicht mehr eine einzelne chemische Gruppe innerhalb des riesigen Moleküls.

Nach Kestner[3]) können nur solche Farbstoffe für Lokalisationsstudien und für die chemische Charakterisierung der gefärbten Substanz benutzt werden, die keine Kolloide sind und mit dem Eiweiß der Zellen gefärbte Salze bilden. Färbungen, die durch Adsorption oder durch Reaktion zwischen Kolloiden zustandekommen, sind unbrauchbar. Die Mehrzahl der Färbungen kommt aber auf letztere Weise zustande.

Die pflanzlichen Gewebe verhalten sich gegenüber sauren und basischen Farbstoffen nach Naylor[4]) wie ein Eiweißstoff, dessen iso-

---

[1]) Dies gilt nicht nur für Farbstoffe; nach Keller ist z. B. Mac Callums Kalium-Reaktion eine reine Kathodenfärbung. Leuthardt schlägt aber vor, in der Elektrostatik der Zellen und Gewebe die Bezeichnungen „Anoden" und „Kathoden" zu vermeiden und nur von positiven und negativen Punkten zu sprechen. — F. Leuthardt, Grundlagen und Grenzen biologischer pH-Bestimmungen, Kolloidchem. Beihefte, 1929, XXVIII, S. 262.

[2]) P. G. Unna, Die Sauerstofforte und Reduktionsorte. Eine histochemische Studie. Arch. mikrosk. Anatom. 1916 LXXXVII. S. 96.

[3]) O. Kestner, Zur Chemie mikroskopischer Färbungen, Arch. f. Dermatologie und Syphilis, Orig., 1921, CXXX, S. 472.

[4]) E. E. Naylor, The hydrogen-ion concentration and the staining of sections of plant tissue, Amer. Journ. of Bot., 1926, XIII, S. 265, Ref. in Zeitschr. wiss. Mikr., 1928, XLV, S. 238.

elektrischer Punkt zwischen pH 4,6 und 5 liegt. Das Plasma hat einen mehr sauren isoelektrischen Punkt als die verschiedenen Teile des Kerns. Saure Farbstoffe werden bei pH 3,5—4,6 festgehalten und gehen von pH = 5 an um so mehr in Lösung, je stärker alkalisch die Flüssigkeit ist. Basische Farbstoffe werden bei pH 5,6—7,3 zurückgehalten und gehen bei stärkerer saurer Reaktion in Lösung.

Man kann deshalb durch Auswahl saurer oder basischer Farbstoffe und durch Waschen mit Lösungen von bestimmter Wasserstoffionen-Konzentration differenzierte Färbungen erhalten. Die Schnitte werden vor dem Färben 10 Minuten lang, nach dem Färben 6 Stunden lang in Pufferlösungen aus $^{N}/_{10}\,H_3PO_4$ und $^{N}/_{10}\,NaOH$ gebracht.

Differential-Färbung wurde durch folgendes Verfahren erzielt. Fixierung in Chrom-Essigsäure, Entwässerung durch Weingeist, Chloroform, Paraffin. Die Mikrotomschnitte wurden zur Entfernung des Paraffins mit Xylol behandelt, dann durch Weingeist verschiedener Stärke in redestilliertes Wasser übertragen, die Objektträger mit den Schnitten kamen dann auf wenige Minuten in 100 ccm Phosphat-Puffer verschiedener pH und 5—10 Minuten in wässerige Farbstofflösung[1]). Man wäscht dann die Schnitte 6 Stunden in denselben Pufferlösungen, indem man die Lösung alle 2 Stunden erneuert. Entwässern mit Weingeist, Klären, Einlegen in Balsam.

Cytologische Färbungen, auch die Doppelfärbungen dienen nach Lundegårdh vorwiegend nur als Mittel, die fixierten Strukturen leichter sichtbar zu machen und dürfen nicht als zuverlässige mikrochemische Reagentien betrachtet werden. Auch wird die Färbung von der vorhergehenden Fixierung beeinflußt.

Fixierung und Färbung in einer Operation („chromatische Fixierung") erreicht O. Baumgärtel[2]) mit folgender Lösung (Ps. S. H. A."): Destill. Wasser 80 ccm, Alaun 1 g, Hämateïn Grübler 0,1 g, 96proz. Weingeist 20 ccm, Pikrinsäure 0,5 g, Sublimat 1 g. Zur Herstellung vermischt man zunächst die durch vorsichtiges Erwärmen des Häma-

---

[1]) Saure Farbstoffe: Eosin, Gelb Nr. 512 (Schultzsche Tabelle), Methylblau (Grübler Nr. 478), Martius Gelb (Bausch and Lomb Nr. 3), Orange G (Bausch u. Lomb Nr. 14).

Basische Farbstoffe: Malachitgrün (Bausch u. Lomb Nr. 427), Toluidinblau (Grübler Nr. 654), Safranin (Grübler Nr. 584) und basisches Fuchsin Will Corporation Nr. 448.

Die Farbstoffe wurden meist in 1proz. Lösungen verwendet.

[2]) O. Baumgärtel, Chromatische Fixierung, Ber. deutsch. bot. Ges., 1918, XXXVI, S. 318.

teïns in dem Weingeist bereitete Lösung mit der Lösung des Alauns in dem kochenden destillierten Wasser. Unter Umrühren mit einem Glasstab setzt man die Pikrinsäure zu und nach deren Lösung das Sublimat. Die in roter Flasche aufbewahrte Lösung hält sich unbegrenzt lange.

Vielschichtige Gegenstände brauchen etwa 12 Stunden, ehe sie druchdrungen sind, im allgemeinen läßt man 5—6 Stunden einwirken, bei einzelligen zarten Organismen kann schon einhalbstündige Einwirkung genügen.

Nach genügender Einwirkung dekantiert man die Lösung, die man, bis sie in schmutziges Olivgrün umschlägt, immer wieder gebrauchen kann, wäscht die Gegenstände mit reinem Wasser, bis dieses durch die Pikrinsäure nicht mehr gelb gefärbt wird und bringt sie dann in 96 proz. Weingeist, Weingeist-Xylol (1 : 1) und Xylol, worauf das zum Schneiden bestimmte Material in Paraffin eingebettet, geschnitten und in Kanadabalsam eingeschlossen werden kann. Überfärbte Schnitte kommen über Weingeist-Xylol und Weingeist zur Differenzierung in eine dreiprozentige wässerige Alaunlösung. Überfärbte Gegenstände, die nicht geschnitten werden müssen, lassen sich nach dem Auswaschen mit Wasser und der Alaunlösung differenzieren. Sind sie richtig gefärbt, so kommen sie nach dem Durchlaufen der Skala direkt auf den Objektträger in einen Tropfen stark verdünnter Lösung von Kanadabalsam, worauf man nach Aufsetzen des Deckglases das überschüssige Xylol abdunsten läßt; je zarter das Präparat, desto verdünnter soll die Lösung des Kanadabalsams sein.

Die Zellbestandteile zeigen danach folgendes Verhalten:

Membran: Zellulosemembranen farblos, pektinöse leicht violett. Plasma: Leicht violett bis farblos. Chloroplasten: Hellviolett. Algenchromatophoren oft kräftiger gefärbt. Pyrenoide: Zonärer Bau; Zentrum rötlichviolett, eine farblose Mittelzone und eine blauviolette Außenzone. Chromatin: Dunkelviolett. Kerngerüst und Kernsaft: Bläulich bis farblos. Kernmembran: Farblos, aber gut zu unterscheiden. Nukleolus: In höheren Pflanzenkernen farblos oder schwach violett gefärbt; bei Oedogonium stark violett, oft mit einem leichten rötlichen Ton.

Durch Verwendung substantiver Farbstoffe[1]), deren Farbe mit dem Dispersitätsgrade wechselt, ist es möglich, mit einem Farbstoff verschiedenartige Gewebe in verschiedenen Farben zu färben und die Farben

[1]) Fr. Schwarz, Meta[illegible] n pflanzlicher Zellwände substantive Farbstoffe. Ber. [illegible]utsch. bot. Ges., 1924, XLII, S. (21) u. (28).

in Dauerpräparaten festzuhalten. Da die Färbung in erster Linie durch den Zustand beeinflußt wird, in welchem sich die Wandgele befinden, so erlaubt die Art der Färbung gleichzeitig ein Urteil über deren Beschaffenheit. In den Zellin-Wänden (Wände von Kambiumzellen, unverholzten Parenchymzellen und Bastfasern, Kollenchym, Reservezellulosezellen) wird der Farbstoff in der Farbe der größten Farbstoffteilchen abgelagert, in den Lignin-Wänden (verholzte Zellwände, Zelluloseester) in der des mittleren, und in den Kutinwänden (Kutikula, kutinisierte und verkorkte Membranen) in der des höchsten Dispersitätsgrades. Kallinwände stehen zwischen Zellin- und Ligninwänden.

Die Schnitte werden, falls erforderlich (Bleichung von Wänden, Beseitigung von Zellinhalt) 5—10 Minuten mit einer etwa 0,1—0,2 % wirksames Chlor enthaltenden Javelleschen Lauge behandelt und mit Wasser oder Weingeist (ev. nach Vorbehandlung mit 5proz. Thiosulfatlösung) gut ausgewaschen.

Zur Bereitung der Farbstofflösungen werden in der Regel 0,75 bis 1,0 g (bei schwerlöslichen Farbstoffen 0,25—0,5 g) Farbstoff auf dem Wasserbad in 67 ccm destilliertem Wasser gelöst und nach dem Erkalten 33 ccm einer 6proz. Lösung von kristallisiertem Natriumsulfat hinzugefügt.

Die Schnitte kommen in der Regel 3 Tage in die in kleinen verschließbaren Gläschen befindliche vorher gut durchgeschüttelte Farbstofflösung, dann bringt man sie zur Lösung etwa anhaftender Farbstoffflocken in — wenn nötig, mehrmals erneuertes — destilliertes Wasser, dann in kalkhaltiges Leitungswasser (ev. Gipswasser oder verdünnte Lösung von Aluminiumsulfat) und dann in Hoyersche Einschlußflüssigkeit. Man kann auch mit absolutem Alkohol rasch entwässern und in Kanadabalsam einschließen.

Die mit den brauchbarsten Farbstoffen erzielten Färbungen ergeben sich aus folgender Übersicht:

Farbstoff	Zellin-Wände	Lignin-Wände	Kutin-Wände
Brillantcongoblau 2 RW Oxaminblau 4R	blau bis violett	violettpurpur, purpur, rot	rot u. rotorange
Columbiablau B Diaminschwarz B4	blau	violett bis purpurviolett	jung: violett, dicht: farblos
Dianilschwarz N Oxydiaminschwarz 2R Sambesischwarz D	schwarzblau, grau, mattviolett	schwarzviolett, orange, braun, gelb	rotbraun, orange, gelb

Optisches

Die Leistungsfähigkeit des Mikroskopes erschöpft sich nicht in der Darbietung hoher Vergrößerung, vielmehr gibt die Optik dem Mikroskopiker, also auch dem Mikrochemiker, noch besondere Untersuchungsverfahren an die Hand, die für seine Arbeiten vorzügliche Hilfsmittel sein können. Es gilt dies in erster Linie für die Erscheinungen im polarisierten Lichte. Sie dienen zur näheren Bestimmung von Kristallen, zur Auffindung sehr feiner kristallinischer Niederschläge, die sich der Wahrnehmung im gewöhnlichen Lichte entziehen und zur Untersuchung organisierter Zellbestandteile, von Membranen, der Stärke und der großen Gruppe der Kolloide, der auch so viele Bestandteile des Pflanzenkörpers angehören. Für diese Untersuchungen ist ein besonderes Polarisationsmikroskop außerordentlich wertvoll, für

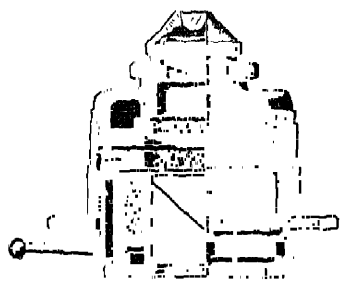



Fig. 21. Polarisationskondensor

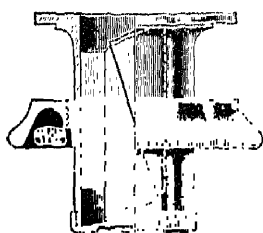



Fig. 22. Polarisator zum Einhängen in den Dia-

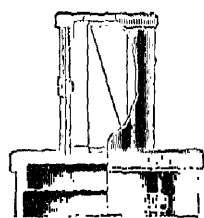



Fig. 23. Analysator

eingehende Studien auch notwendig. Beschränkt man sich aber auf die einfacheren Prüfverfahren, wie sie hier angedeutet werden sollen, so kommt man ohne solches aus; denn eine einfache Polarisationseinrichtung kann auch dem gewöhnlichen Arbeitsmikroskop in der Regel angefügt werden. Notwendig ist allerdings, daß das Mikroskop wenigstens einen drehbaren Tisch besitzt, der womöglich mit einer Teilung am Rande versehen werden sollte. Die einfache Polarisationsvorrichtung besteht aus zwei polarisierenden (Nicolschen) Prismen, dem Polarisator und dem Analysator, die dem durchgehenden Lichte eine bestimmte Schwingungsrichtung geben. Der erstere wird dem Beleuchtungsapparat des Mikroskopes unterhalb des Tisches eingefügt, indem man ihn entweder mit dem Kondensor verbindet (Polarisationskondensor (Fig. 21)) oder ihn in den Diaphragmenträger einhängt (Fig. 22). Der Analysator (Fig. 23) ist oberhalb des Objektivs in den Strahlengang einzufügen; am einfachsten ist es, ihn auf das Okular zu setzen. Zweckmäßig benutzt man ein Okular mit Strichkreuz. Dreht man nun den Analysator um die Achse des Mikroskopes, nachdem man das aufgelegte Präparat beiseite geschoben hat, so wird man finden, daß die Helligkeit des Gesichtsfeldes wechselt. Bei einer ganzen Um-

drehung gibt es zwei Stellungen des Analysators, in denen das Gesichtsfeld am hellsten, und zwei um 90⁰ verschiedene Stellungen, in denen es dunkel erscheint. Im letzteren Falle sind die Nicols mit ihren Schwingungsrichtungen S—S[1]) gekreuzt, im ersteren Falle einander parallel. Man beobachtet das Präparat in der Regel zwischen gekreuzten Nicols, hat diese also vor der Beobachtung im polarisierten Lichte zu kreuzen. Dabei soll das Strichkreuz des Okulars den Schwingungsrichtungen der Nicols parallel sein.

Erscheint nun bei der Betrachtung zwischen gekreuzten Nicols das Präparat dunkel, und bleibt es auch stets in allen seinen Teilen dunkel, wenn es um 360⁰ gedreht wird, so hat man es mit Körperchen zu tun, die man als einfachbrechend (isotrop) bezeichnet; dazu zählen amorphe Substanzen und die Kristalle des regulären Systems. Sie kann man nicht im polarisierten Licht untersuchen. Zeigt aber das Präparat während der Drehung in seiner ganzen Ausdehnung oder in einzelnen Teilen wechselnde Helligkeit, so gibt es vier Stellungen des Tisches, in denen ein bestimmtes Teilchen, das man beobachtet, dunkel, und vier Stellungen, in denen es am hellsten erscheint. Solche Körper werden doppelbrechend (anisotrop) genannt. Das Licht, welches in einen doppelbrechenden Körper eindringt, wird im allgemeinen in zwei Lichtwellen zerlegt, die sich, jede für sich, mit verschiedener Geschwindigkeit im Körper fortpflanzen und deren Schwingungen senkrecht zueinander und zur Fortpflanzungsrichtung erfolgen. Die beiden Wellen sind, wie man sagt, geradlinig und senkrecht zueinander polarisiert (Polarisationsebene senkrecht zur Schwingungsebene). Nach dem Durchgang werden die beiden Lichtwellen durch den Analysator zur Interferenz gebracht. Die vier Stellungen der Dunkelheit geben die Lagen des beobachteten Teilchens an, in denen die Schwingungsrichtungen des Lichtes im doppelbrechenden Körperchen mit denen in den Nicols zusammenfallen. Wenn im Präparate die verschiedenen Teilchen in ganz verschiedenen Stellungen des Objekttisches ausgelöscht werden, weichen die Schwingungsrichtungen des Lichtes in den Teilchen voneinander ab; werden alle Teilchen gleichzeitig ausgelöscht, so sind die Schwingungsrichtungen in allen gleich gerichtet. Liegt dabei das Strichkreuz parallel den Schwingungsrichtungen der Nicols, so werden durch seine Striche bei der Auslöschung auch die Schwingungsrichtungen des

[1]) Man unterrichte sich über die Vorgänge bei der Polarisation des Lichtes, die einschlägigen Bezeichnungen und über das Polarisationsmikroskop, sowie seine Anwendung eingehender etwa in den Werken: Das Polarisationsmikroskop von Dr. Ernst Weinschenk, bearbeitet von Dr. J. Stiny, Freiburg i. B. 1925 und Das Polarisationsmikroskop, seine Anwendung in der Kolloidforschung und in der Färberei von H. Ambronn und A. Frey, Leipzig 1926.

Lichtes in den beobachteten Teilchen angezeigt. Damit ist eine bequeme Methode zur Bestimmung der Auslöschungsschiefe der Kristalle und ähnlicher Körper gegeben.

Stellt man nämlich zunächst eine auffällige Kristallkante oder sonst eine ausgezeichnete Richtung des doppelbrechenden Körpers parallel zu einem Striche des Fadenkreuzes und liest die Stellung des Tisches an seiner Gradteilung ab, dreht dann das Präparat, bis der Körper dunkel erscheint, so gibt der Drehungswinkel des Tisches den Winkel an, welchen die eine Schwingungsrichtung im Körper mit der zum Ausgangspunkt genommenen ausgezeichneten Richtung bildet. Man nennt diesen Winkel die Auslöschungsschiefe des doppelbrechenden Körpers; sie ist eine charakteristische Konstante für den betreffenden Körper. Die Bestimmung wird in weißem Lichte nur unvollkommen erreicht, wenn der Winkel wie z. B. bei triklinen Kristallen für verschiedene Farben verschieden ist. Genauer läßt sich die Bestimmung dann im monochromatischen Lichte machen. Ist der Winkel null, so spricht man von gerader Auslöschung; diese wird man insbesondere bei linearer Erstreckung des doppelbrechenden Körpers (Kristallnadeln) antreffen.

Bei der Untersuchung von Kristallen ist das erste Ziel der Arbeiten mit dem Polarisationsmikroskop, möglichst sicher das Kristallsystem des zu untersuchenden Körpers zu finden. Hierüber gibt die Gestalt der Kristalle, die Bestimmung der Auslösungsschiefe und die Ermittelung, ob der Kristall optisch einachsig oder zweiachsig ist, Auskunft. Optisch einachsig ist ein nicht regulärer Kristall, wenn es in ihm nur eine einzige Richtung gibt, in der er, zwischen gekreuzten Nicols beobachtet, bei Drehung des Tisches um die Mikroskopachse stets dunkel bleibt, sich also wie ein einfachbrechender Körper verhält. In optisch zweiachsigen Kristallen dagegen gibt es zwei derartige Richtungen. Man stellt das durch Beobachtung der Achsenbilder der Kristalle im sog. konvergenten polarisierten Lichte fest. Im allgemeinen kann man sich nach Fuchs-Braun[1]) mit der folgenden Anleitung für die Ermittelung des Kristallsystems begnügen:

I. „Alle Kristalle bleiben bei gekreuzten Nicols in jeder Lage dunkel; sie sind einfach brechend, regulär (Caesiumalaun).

II. Die meisten Kristalle werden zwischen gekreuzten Nicols hell (oft nur grau) und farbig und besitzen gerade Auslöschung, einzelne bleiben in allen Lagen dunkel; sie sind doppelbrechend und optisch einachsig. Man hat weiter den Umriß der dunkel bleibenden Kristalle zu beachten:

[1]) Fuchs-Braun, Anleitung zum Bestimmen der Mineralien, Gießen, 1907, S. 71.

a) der Umriß der dunkel bleibenden Kristalle ist vierseitig (oder achtseitig), quadratisch, die Kristalle sind quadratisch [tetragonal] (Kalziumoxalat);
b) der Umriß ist sechsseitig, die Kristalle sind hexagonal (Kieselfluornatrium);
c) der Umriß der dunkel bleibenden Kristalle ist dreiseitig; die Kristalle sind rhomboedrisch (Natronsalpeter).

III. Alle Kristalle werden zwischen gekreuzten Nicols hell (oft nur grau) und farbig, sie sind optisch zweiachsig:
a) alle besitzen gerade Auslöschung, sie sind rhombisch (Chlorblei);
b) die meisten besitzen schiefe, einige gerade Auslöschung, sie sind monoklin (Gips);
c) alle Kristalle zeigen schiefe Auslöschung, sie sind triklin (Kupfervitriol)."

Eine weitere Charakteristik der doppelbrechenden Körper wird durch ihr Verhalten gegenüber den Gipsplättchen, die man der Polarisationsvorrichtung des Mikroskopes hinzufügen kann, gegeben. Man unterscheidet Gipsplättchen Rot I.—IV. Ordnung, von denen das Gipsplättchen Rot I. Ordnung am meisten gebraucht wird. Es ist ein dünnes Plättchen, das zwischen Schutzgläsern eingeschlossen, in Papp- oder Metallrahmen gefaßt wird. Die Dicke des Gipsplättchens selbst ist so abgestuft, daß es im Mikroskop zwischen gekreuzten Nicols rot erscheint, wenn die Schwingungsrichtungen in ihm unter 45° zu den Schwingungsrichtungen der Nicols stehen. Man schaltet es entweder unmittelbar über dem Polarisator in den Beleuchtungsapparat ein oder legt es unterhalb des auf das Okular aufgesetzten Analysators auf das Okular; bei den Polarisationsmikroskopen mit über dem Objektiv einschaltbar angeordneten Analysatoren wird es in einen Schieber unterhalb des Analysators eingelegt. Die rote Farbe des Plättchens schlägt sofort in eine andere um, wenn auch nur schwach doppelbrechende Körper in dem mikroskopischen Präparat vorhanden sind, deren Schwingungsrichtungen nicht gerade mit denen der Nicols zusammenfallen. Das Gipsplättchen gibt also einmal ein viel empfindlicheres Kriterium dafür, ob ein Körper doppelbrechend ist oder nicht, und wo die Schwingungsrichtungen liegen, als es die Beobachtung lediglich der Auslöschung ist. Weiter dient aber die eintretende Farbänderung, die in ihrer Art sehr verschieden sein kann, dazu, den Charakter der Doppelbrechung zu bestimmen. Am stärksten ist nämlich die Wirkung, wenn die Schwingungsrichtungen im doppelbrechenden Körper mit denen des Gipsplättchens übereinstimmen, wenn sie also auch unter 45° zu den Schwingungsrichtungen der Nicols liegen. Man erreicht dies in jedem Falle durch Drehung des Präparates. Es wird alsdann der durch die Doppelbrechung im Gipsplättchen hervorgerufene

Phasenunterschied um den im doppelbrechenden Körper verstärkt (Additionsfarbe: die rote Farbe wird in eine höhere der Farbenskala dünner Plättchen verwandelt) oder herabgesetzt (Subtraktionsfarbe: die rote Farbe geht in eine niedrigere der Farbenskala über). Sehr dünne Kristalle z. B. erscheinen zwischen gekreuzten Nicols noch nicht rein weiß oder farbig, sondern grau. Mit dem Gipsplättchen Rot I. Ordnung wird ihre Farbe blau (Additionsfarbe) oder gelb (Subtraktionsfarbe), je nachdem die Schwingungsrichtungen der schnelleren und damit auch der langsameren Wellen in beiden gleichgerichtet sind, oder ob die Schwingungsrichtungen der schnelleren Wellen des einen mit der der langsameren Welle des anderen zusammenfällt. Die ersteren nennt man positiv doppelbrechend, die letzteren negativ doppelbrechend. Dabei ist Voraussetzung, daß die Schwingungsrichtung der schnelleren Welle des Gipsplättchens von hinten links nach vorn rechts im Gesichtsfeld des Mikroskops unter 45° verläuft, wenn die Schwingungsrichtungen der Nicols in der Symmetrieebene des Mikroskops bzw. senkrecht dazu liegen. Denn eine bestimmte Lage des Gipsplättchens muß eingehalten werden, da sich mit einer Drehung des Plättchens um 90° die Additionsfarbe in die Subtraktionsfarbe und umgekehrt ändert. Auf der Fassung der Gipsplättchen muß diese Richtung gekennzeichnet sein.

Ebenso ist es nötig, in dem zu untersuchenden Körper eine bestimmte Richtung festzulegen, die mit der ausgezeichneten Achse des Gipsplättchens zusammenfallen muß, auf die bezogen der Charakter der Doppelbrechung festgelegt wird. Z. B. kann man aus zähflüssigem Pflanzengummi sehr lange dünne Fäden ziehen, die doppelbrechend sind. Liegt dabei die Zugrichtung der ausgezeichneten Achse des Gipsplättchens parallel, so zeigen Fäden aus arabischem Gummi die Farbe indigoblau, eine Additionsfarbe, die Fäden von Kirschgummi die Farbe gelb, eine Subtraktionsfarbe. Hiernach darf man von positiver Doppelbrechung des arabischen Gummis und von negativer Doppelbrechung des Kirschgummis sprechen, muß aber hinzufügen „in bezug auf die Längsachse der Fäden“. Denn bei Drehung der Präparate um 90° wird die Erscheinung entgegengesetzt.

Die Gipsplättchen höherer Ordnung sind bei starker Doppelbrechung der zu untersuchenden Körper in entsprechender Weise zu verwenden oder zur Kontrolle mit heranzuziehen, wenn die Farbänderung mehr als eine Ordnung beträgt und man im Zweifel über die Ordnung der vorliegenden Farbe ist. Neben den Gipsplättchen werden dabei auch Glimmerplättchen mit Gangunterschieden der beiden Lichtwellen von $^1/_8$ bis $^1/_2$ Wellenlänge benutzt.

Nicht nur der Charakter der Doppelbrechung, sondern weiterhin auch die Stärke der Doppelbrechung, die Drehung der Polarisations-

ebene in optisch aktiven Körpern und anderes gibt bestimmte Merkmale zur Erkennung und Beschreibung der Substanzen. Es ist hier nicht der Ort, über alle diese Prüfmöglichkeiten zu berichten; sie setzen Sonderapparate zum oder neben dem Mikroskop voraus, die nur in wenigen Fällen zur Verfügung stehen werden. In einschlägigen Lehr- und Handbüchern der Mineralogie wird man sich darüber im Notfalle unterrichten können. Wir wollen uns darauf beschränken, noch eine Probe mit einfachen Mitteln anzuführen, die Prüfung auf die Mehrfarbigkeit der Körper (Pleochroismus — Dichroismus). Sie beruht auf verschiedener Absorption der einzelnen Spektralfarben im doppelbrechenden Körper, je nachdem es sich um die schnellere oder langsamere Welle handelt. Man prüft auf Mehrfarbigkeit nur mit einem Nicol, und zwar beim Mikroskop mit dem Polarisator. Hat man ein doppelbrechendes gefärbtes Präparat auf dem Objekttisch des Mikroskopes bei eingeschaltetem Polarisator und dreht nun den Objekttisch, so wird man bei Vorhandensein von Mehrfarbigkeit einen Farbenwechsel bei Drehung um 90° wahrnehmen. Je nachdem die Schwingungsrichtung der schnelleren oder langsameren Welle mit der Schwingungsrichtung im Polarisator zusammenfällt, kommt allein die eine oder andere Lichtwelle zur Geltung und zeigt die Mischfarbe, welche durch die ihr eigentümlichen Absorptionsverhältnisse in den einzelnen Spektralbezirken entsteht. In den dazwischen liegenden Richtungen treten Mischfarben auf, welche durch das Zusammenwirken beider Wellen in verschiedenem Maße entstehen. Wird dabei die stärker gebrochene, also die langsamere Welle, stärker absorbiert als die schnellere, so spricht man von positivem, im anderen Falle von negativem Dichroismus. Dabei kann der Charakter der Mehrfarbigkeit für die einzelnen Farben verschieden sein; bei den Freyschen Metallfärbungen von Fasern z. B. ist er für rot und gelb meist negativ und für blau positiv[1]).

Die Arbeiten von Ambronn und Frey zeigen ganz besonders, wie wertvoll Polarisationsbeobachtungen für das Studium der Feinstruktur sein können[2]).

Bestimmung der Brechungsexponenten

Von den Mineralogen wird schon seit langem (Thoulet, Bull. Soc. Min. France, 1880, III, S. 62) zur Identifizierung von Mineralien als Konstante der Brechungsindex herangezogen. Die verschiedenen

[1]) A. Frey, Die Technik der dichroitischen Metallfärbungen, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1925, XLII, S. 421.

[2]) A. Frey, Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen von Hermann Ambronn und seiner Schule, Kolloidzeitschr., 1928, XLIV, S. 5.

Methoden beruhen auf der Beobachtung der Lichterscheinungen an der Grenze zweier Körper von verschiedenem Brechungsindex. Der eine Körper ist eine Flüssigkeit von bekanntem Brechungsindex; in sie wird der feste Körper, dessen Index bestimmt werden soll, eingebettet. Das Verfahren wird daher allgemein als Einbettungsmethode bezeichnet. Sie ist insbesondere von Schroeder van der Kolk[1]) und von Kley[2]) für die Bedürfnisse der Praxis durchgearbeitet worden. Sie benutzten zur Ausführung eine größere Anzahl von Flüssigkeiten von bekanntem Brechungsindex, die sie in eine Reihe von steigendem Index ordneten und so auswählten, daß nicht zu weit auseinander liegende Glieder der Reihe mit möglichst gleichem Siedepunkte noch zur Erzielung von Zwischenwerten miteinander mischbar waren. Dabei dürfen sich natürlich die zu prüfenden Substanzen in den Flüssigkeiten nicht lösen. Ist dies doch der Fall, dann muß man nach Kerbosch[3]) die betreffenden Flüssigkeiten zuvor mit der zu messenden Substanz sättigen, hat dann aber von den gesättigten Flüssigkeiten die Brechungsexponenten mit einem Refraktometer[4]) festzustellen.

Man legt zur Ausführung einer Messung Teilchen des zu prüfenden Körpers, etwa in Körnerform auf den Objektträger in einen Tropfen einer Flüssigkeit mit mittlerem Brechungsexponenten. Mit Hilfe der Beckeschen Linie[5]) läßt sich dann zunächst feststellen, ob die Substanz stärker oder schwächer bricht als die Flüssigkeit, indem man bei enger Blendenöffnung auf eine Kante des Körpers scharf einstellt und nun den Tubus (oder nur das Okular) hebt. Es entsteht dann eine feine, helle Lichtlinie, die parallel zur Kante gegen das höher brechende Medium hin fortschreitet. Bricht der eingebettete Körper stärker, dann liegt der Lichtschein gewissermaßen auf dem Körper. Ist er schwächer brechend, dann wandert der umhüllende Lichtschein beim Heben des Tubus von dem Körper ab. Nach dieser Feststellung wiederholt man den Versuch mit einer anderen Flüssigkeit, wählt aber nicht die mit dem

[1]) Schroeder van der Kolk, Tabellen zur mikr. Bestimmung der Mineralien nach ihrem Brechungsindex, Wiesbaden 1900; II. Auflage 1905 von Beckmann bearbeitet.

[2]) Behrens-Kley, Mikrochemische Analyse von P. D. C. Kley, 1915,

[3]) J. M. Kerbosch, Bildung und Verbreitung einiger Alkaloide in Pa somniferum L., Arch. d. Pharm., 1910, **248**, S. 536.

[4]) Es sind aber auch verschiedene Methoden ausgearbeitet worden, um den Brechungsexponent einer Flüssigkeit mit dem Mikroskop zu bestimmen, so z. B. von E. Clerici, Rendiconti R. Ac. Lincei Roma 1907, **16**, S. 336 und C. Viola, ebenda 1910, **19**, S. 192; Zeitschr. f. Krist. 1913, **52**, S. 301.

[5]) Becke, Sitzgsber. Wien. Akad., 1893, **102**, S. 358.

nächst höheren bzw. niederen Index, sondern überspringt mehrere Glieder der Reihe, um zu Grenzwerten zu gelangen. Zwischen ihnen operiert man weiter und mischt womöglich zwei für die Einbettung besonders geeignete Flüssigkeiten in verschiedenem Verhältnis so lange, bis es gelingt, die Umrisse des Körpers in der Flüssigkeit verschwinden zu lassen, was allerdings vollkommen nur bei monochromatischem Lichte möglich ist. In weißem Lichte zeigt zunächst die Beckesche Linie an, daß die Brechungsindizes von Körper und Flüssigkeit noch nicht übereinstimmen. Wird der Unterschied sehr gering, so treten Farbenerscheinungen am Rande des Körpers auf, welche auf der verschiedenen Dispersion des Körpers und der Flüssigkeit beruhen. Unsymmetrische Farbenränder bei schiefer Beleuchtung deuten dann auf Übereinstimmung der Brechungsindizes bei einer mittleren Wellenlänge hin.

Doppelbrechende Körper mit mehrfachem Brechungsindex werden in gleicher Weise eingebettet und zwischen gekreuzten Nicols in die Auslöschungslage gebracht. Dann wird der Analysator entfernt und der Brechungsindex bestimmt. Darauf dreht man den Objekttisch um 90° und stellt den Brechungsindex für die andere Lichtschwingung in dem Körper fest. Kristallographisch richtig ist die Methode, wie Kley betont, bei optisch einachsigen Kristallen; bei optisch zweiachsigen sind eigentlich drei Indizes zu bestimmen, wozu verschiedene Schnitte des Körpers notwendig sind.

Von den von Schroeder van der Kolk angegebenen Flüssigkeiten[1]) seien folgende genannt:

I. Hexan 1,37, Heptan 1,39, Cajeputöl 1,46, Olivenöl 1,47, Rizinusöl 1,49, Benzol, Xylol, Buchenkernöl 1,50, Zedernöl 1,51, Nelkenöl 1,53, Anisöl 1,56, Bittermandelöl 1,60, Schwefelkohlenstoff 1,63, α-Monobromnaphthalin 1,66, Methylenjodid 1,76, Phenylsulfid 1,95. — II. Methylalkohol 1,32, Wasser 1,34, Äthyläther 1,36, Äthylalkohol 1,37, Amylalkohol 1,40, Chloroform 1,45, Glyzerin 1,47, Kreosot 1,54, Anilin 1,60, Kadmiumborowolframat 1,70, Kaliumquecksilberjodid 1,72, Baryumsilberjodid 1,79, Lösung von Quecksilberjodid in Anilin und Chinolin 2,20.

Zweckmäßig ist es, sich einige wenige gut mischbare Flüssigkeiten zurechtzulegen, die in verschiedenem Verhältnis miteinander gemischt werden können. Darüber und über weitere Einzelheiten möge die einschlägige Literatur[2]) nachgesehen werden. Ganz besondere Verhältnisse kommen, wie die Arbeiten von H. Ambronn und A. Frey[3]) zeigen, bei den Fasern in Betracht.

[1]) Zu erhalten bei Dr. F. Krantz, Rheinisches Mineralienkontor, Bonn.

[2]) K. Spangenberg, Die Einbettungsmethode, Fortschr. d. Mineral., Kristallogr. u. Petrogr., 1920, **7**, S. 3.

[3]) A. Frey, Das Brechungsvermögen der Zellulosefasern, Kolloidchem. Beihefte, 1927, **23**, S. 40.

Dunkelfeldbeleuchtung und Ultramikroskopie

Eine wichtige Ergänzung des Mikroskopes ist neben der Polarisationsvorrichtung der Dunkelfeldkondensor. Die Dunkelfeldbeleuchtung läßt die mikroskopischen Objekte dadurch, daß die beleuchtenden Strahlen nicht als solche in das Auge des Beobachters gelangen, auf dunklem Grunde mit hellen Konturen hervortreten und zeigt auf diese Weise auch feine Partikelchen hell auf dunklem Grunde (positives Bild), die bei Hellfeldbeleuchtung wegen mangelnden Kontrastes zur Umgebung nicht zur Wahrnehmung kommen (Staubteilchen, feine Risse u. a.). Sie ist daher da die notwendige Ergänzung der gewöhnlichen mikroskopischen Beobachtung, wo es sich um feine Ein-

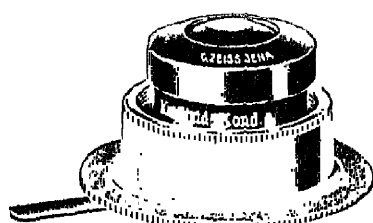



Fig. 24. Kardioidkondensor für Dunkelfeld und Ultra-

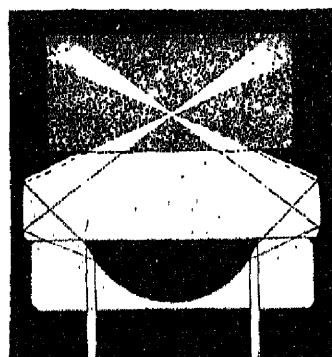



Fig. 25. Strahlengang im Dunkelfeld- (Kardioid-) Kondensor: Innerhalb des Beleuchtungskegels ist Raum für das die Beobachtung ermöglichende abgebeugte Licht

schlüsse mit von der Umgebung abweichendem Brechungsindex handelt. Der Einblick in die innere Struktur einer Zelle z. B., mag sie nun ein selbständiges Gebilde oder nur ein Teil des Ganzen sein, wird bedeutend erleichtert. Die Dunkelfeldbeleuchtung ist auch die notwendige Vorbedingung für ultramikroskopische Beobachtungen, also für ein Studium von Teilchen, die durch das Mikroskop nicht mehr nach ihrer Gestalt abgebildet, durch die kontrastreiche Beleuchtung aber dennoch sichtbar gemacht werden. Insbesondere das Studium kolloider Substanzen ist durch die ultramikroskopische Beobachtung außerordentlich gefördert worden. Durch sie ist ein weitgehender unmittelbarer Einblick in die innere Struktur der Kolloide möglich geworden. Trotz fehlender Abbildung können über Gestalt und Größenverhältnisse durch Auszählung des Präparates, Beobachtung der Polarisation u. a., Feststellungen getroffen werden. Neben diesen allseitig ultramikroskopischen, gewissermaßen punktförmigen Gebilden, sind die zweiseitig ultramikroskopischen, linearen Gebilde (Bakterien. Fibrillen) und die flächenhaften, nur noch in einer Erstreckung ultramikroskopischen, die in Plättchen- und

Scheibenform auftreten, für die Untersuchungen geeignet. Bewegte Teilchen (Brownsche Molekularbewegung) und kleine Lebewesen mit Eigenbewegung (Bakterien) sind ohne äußere Beeinflussung und Schädigung (Färbung) der Untersuchung zugänglich zu machen, auch wenn sie isotrop sind.

Die meisten Dunkelfeldkondensoren, wie z. B. der Kardioidkondensor der Firma Zeiss, Fig. 24, können wie andere Kondensoren und an ihrer Stelle am Mikroskop in die Schiebhülse des Beleuchtungsapparates eingeführt werden. Sie gewähren die Möglichkeit, sowohl feine mikroskopische Objekte im Dunkelfeld neben der Beobachtung im Hellfeld zu untersuchen, als auch ultramikroskopische Verteilungen in mikroskopischen Präparaten aufzudecken und zu verfolgen. Eine genügend helle elektrische Mikroskopierlampe (Mikroskopier-Punktlichtlampe oder Mikrobogenlampe) und die für die Beobachtung geeigneten Objektive bilden neben den für das Präparat benötigten Einrichtungen, die sich vielfach auf Objektträger und Deckglas beschränken können, die Ergänzung des Mikroskopes.

Schon früh hat Gaidukov[1]) die Methode in der Botanik angewandt; ebenso ist sie bei der Untersuchung von Fasern und der Erzeugnisse der Textilindustrie herangezogen worden[2]).

Tswett[3]) hat bei botanischen Untersuchungen ein von ihm konstruiertes „Luminoskop" benutzt und weiter bei Chlorophyll- und Cyanophyll-Studien das Fluoreszenzmikroskop von C. Reichert, Wien, angewandt. Fast alle Stoffe können zur Fluoreszenz erregt werden, zu den wenigen Ausnahmen zählen die roten Blutkörperchen, Porzellan u. a. Dem Fluoreszenzmikroskop steht ein weites Arbeitsfeld offen[4]),

---

[1]) N. Gaidukov, Dunkelfeldbeleuchtung und Ultramikroskopie in der Biologie und in der Medizin, Jena, 1910.

[2]) J. Schneider u. G. Kunzl, Spinnfasern und Färbungen im Ultramikroskope, Zeitschr. f. wiss. Mikr. 1906, **23**, S. 393. — A. Herzog, Die mikroskopische Untersuchung der Seide, Berlin, 1924. — H. E. Fierz-David, Die Struktur von Textilfasern, wie sie bei der Dunkelfeldbeleuchtung im Mikroskop gesehen wird. Die Naturwissenschaften, 1929, **17**, S. 703.

[3]) M. Tswett, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1901, XXXVI, S. 450; Ber. deutsch. bot. Ges. 1911, XXIX, S. 744 und O. Heimstädt, Das Fluoreszenzmikroskop, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1911, XXVIII, S. 330.

[4]) Weiteres darüber in: H. Lehmann, Das Lumineszenzmikroskop, seine Grundlagen und seine Anwendungen. Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1913, XXX, S. 417. — R. Wasicky, Das Fluoreszenzmikroskop in der Pharmakognosie, Zeitschr. allg. österr. Apothek. Ver., 1913, LI, S. 525. — A. Policard, Fluoroskopie, Bull. d. histol. appl. et de techn. micr. 1925, II, S. 167. — W. Danckwortt, Lumineszenzanalyse im filtrierten ultravioletten Licht (Leipzig 1929). — G. Kögel, Über die neuesten Verbesserungen des Lumineszenzmikroskopes, Mikrochemie, 1929,

auch für angewandte Zwecke. Verfälschungen lassen sich vielfach an ihrer Lumineszenz als solche erkennen. Sehr geringe Beimengungen von Mutterkorn im Mehl z. B. lassen sich ohne Schwierigkeit feststellen, denn Stärke fluoresziert dunkelviolett, Mutterkorn gelblichweiß. Eine Lumineszenzanalyse kann unter Umständen eine umständliche qualitative Analyse auf Reinheit der Substanz ersetzen.

Verwendet man einen mit destilliertem Wasser gefüllten Glaskolben (Schusterkugel) als Konzentrator für filtriertes ultraviolettes Licht, so kann man bei Verwendung des ultravioletten Lichtes einer Quecksilberdampflampe jedes (kippbare) Mikroskop als Fluoreszenzmikroskop benutzen. Objekt- und Deckgläser, sowie die möglichst dünnwandigen Kolben dürfen nicht selbst fluoreszieren (Kawalierglas fluoresziert nicht. (Heitinger und Reich.[1]))

Zum Nachweis der Fluoreszenz in Geweben werden Mikrotomschnitte von 20—100 μ Dicke trocken auf einen Objektträger gebracht und nach Bedeckung mit Deckglas in das Gesichtsfeld des Fluoreszenz-Mikroskops eingestellt. Dann wird mit einer Pipette Äther, Petroläther u. dgl. zwischen Objektträger und Deckglas gebracht. Kutikula und Gefäßbündel leuchten am intensivsten; sehr stark leuchten auch alle verdickten Zellwände, am schwächsten fluoresziert das Mark. Sehr stark und schön fluoreszieren die Chloroplasten und zwar mit dunkelroter Farbe; gelöste Karotine fluoreszieren schwachgrün. Keimlinge zeigen an den Wurzelspitzen violette, blaue oder gelbe Fluoreszenz. Sehr viele Gewebe leuchten auf Zusatz eines Tropfens 5proz. Natronlauge sofort intensiv grün auf. Diese Erscheinung tritt nach dem Auswaschen der Schnitte mit Wasser nur noch in den Zellwänden auf; in verholzten Geweben läßt sich die grüne Fluoreszenz durch Behandlung mit Natronlauge erzeugen; auch mit Stärke und den Zuckern tritt sie mit Alkali auf.

Über eine Lokalisationsermittlung mit Hilfe der Fluoreszenz s. Aesculin.

G. Klein und H. Linser, Fluoreszenzanalytische Untersuchungen an Pflanzen, Österr. bot. Zeitschr., 1930, LXXIX, S. 125.

Vgl. ferner: O. Vodrážka, Das Mikroskopieren von Holz in filtriertem Ultraviolettlicht, Ztschr. wiss. Mikrosk., 1929, XLVI, S. 497.

VII, S. 305. — P. Metzner, Ein oskop, Zeitschr. wissenschaftl. Mikroskopie 1928, XLV, S. 50. — M. Heitinger, Ein mikroskop mit einfachen Mitteln, Mikrochemie, 1930, VIII, S. 81.

[1]) M. Heitinger u. V. Reich, Die chemische Fabrik 1929, S. 529.

Zählen und Messen

Will man das Mikroskop zum Messen der Breite und Länge mikroskopischer Teilchen benutzen, so ist zu beachten, daß es, abgesehen von schwachen Vergrößerungen, bei denen Objektive mit großem Objektabstand benutzt werden, nicht möglich ist, unmittelbar auf das Präparat geeignete feine Maßstäbe (Objektmikrometer) so zu legen, daß sie gleichzeitig mit dem Präparat durch das Mikroskop betrachtet und unmittelbar zur Ablesung der Maße benutzt werden können. Man muß vielmehr die Messung in dem reellen Zwischenbild, welches das Objektiv allein oder das Objektiv im Zusammenwirken mit dem unteren Teile des Okulars in der Blendenebene des Okulars entwirft, vornehmen. Dazu dienen die Okularmikrometer, runde Glasplättchen von z. B. 19 mm $\emptyset$, die mit einer zweckmäßigen Teilung (z. B. 5 mm in 50 Teile geteilt) versehen sind und auf die Okularblenden gelegt werden. Das Okular soll mit seinem oberen Teile auf diese Teilung einstellbar sein, damit sie jeder Beobachter scharf einstellen kann. Man mißt, indem man das auszumessende Teilchen möglichst in die Mitte des Maßstabes bringt, zunächst die einzelnen Längen in den Werten der Okularteilung. Alsdann rechnet man diese im mikroskopischen Bilde erhaltenen Werte mit dem Umrechnungsfaktor, der von dem benutzten Objektiv, der mechanischen Tubuslänge und gegebenenfalls auch dem Okular abhängt, auf das Präparat um. Für häufigere Messungen ist es zweckmäßig, Objektiv, Tubuslänge und Okularmikrometer so zu wählen, daß sich bei der Umrechnung auf das Objekt für die einzelnen Skalenteile runde Zahlen von einigen $^1/_{100}$ mm oder $^1/_{1000}$ mm ($= \mu$) ergeben, so daß gleich unmittelbare Ablesungen möglich sind. Die Werte des Okularmikrometers, auf das Objekt bezogen, werden durch Vergleich mit einem Objektmikrometer (Eichung) für die in Betracht kommende Optik festgestellt. Für sehr genaue Messungen benutzt man Okularschraubenmikrometer, bei denen über einer Mikrometerskala ein durch eine seitliche Trommel beweglicher Einstellstrich oder ein Strichkreuz verschoben wird, die an die beiden Enden der zu messenden Strecke der Reihe nach angelegt werden. Die beiden Stellungen werden an der Skala und der Trommelteilung abgelesen. Um die Messung in stark gefärbten Präparaten, wenn die feinen Teilstriche nur sehr schwer zu sehen sind, zu erleichtern, hat Hartwich über der Teilung, deren erster Strich zu einem langen schwarzen Strich ausgebildet ist, einen beweglichen Einstellstrich spielen lassen. Das zu messende Teilchen wird an den festen Strich angelegt, der bewegliche Einstellstrich an das andere Ende gelegt und nun nach Entfernung des Präparates die Länge bequem an der jetzt gut sichtbaren Teilung abgelesen.

Längenmessungen mit einer Ablesung bis zu höchstens $^1/_{20}$ mm herab lassen sich gut mit den modernen Kreuztischen und aufsetzbaren Objektführern vornehmen, sofern diese mit Millimeterskala und $^1/_{10}$-Nonius ausgerüstet sind. Die Kataloge der Mikroskopfirmen geben darüber genügenden Aufschluß. Mit Rücksicht auf die Polarisationsuntersuchungen wird man darauf zu achten haben, daß der Tisch drehbar sein und bleiben soll.

Zur Zählung fein verteilter mikroskopischer Körperchen bedient man sich der Objektnetzmikrometer und der Okularnetzmikrometer. Die Auszählung einer Substanz nach ihrem Gehalt an einzelnen Teilchen erfordert zunächst die Abgrenzung einer bestimmten Menge nach Gewicht oder Volumen. Das abgemessene Quantum wird dann auf einem Objektträger ausgebreitet und kann, wenn es sich um verhältnismäßig grobe, einigermaßen regelmäßig verteilte Bestandteile

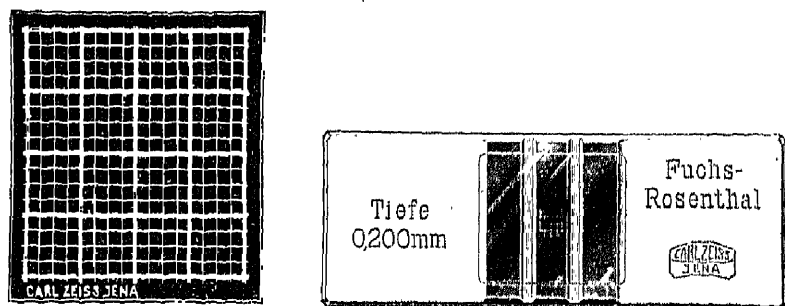



Fig. 26. Fuchs-Rosenthal-Teilung (4 qmm) geteilt in $^1/_{16}$ qmm.

handelt, mit Hilfe eines Kreuztisches oder aufsetzbaren Objektführers (Suchtisches) ausgezählt werden. Es kann das Verfahren zur Ausführung quantitativer mikroskopischer Analyse z. B. von Nahrungs- und Genußmitteln benutzt werden[1]). Ist die Verteilung unregelmäßig, so kommt man mit der Absuchung des Präparates nur mit Hilfe der Tischverschiebung nicht aus, sondern es ist nötig, auf dem Objektträger (oder dem Deckglas) eine Netzteilung zur Hilfe zu haben, deren einzelne Felder der Reihe nach ausgezählt werden[2]), so daß die Gewähr gegeben ist, daß nicht eine Anzahl Teilchen übersehen oder mehrfach gezählt wird. Die Ausbreitung der Substanz muß innerhalb der Netzteilung erfolgen. Da dies bei Flüssigkeiten, deren suspendierte Bestandteile

---

[1]) A. Meyer, Der Artikel Flores Koso d. Arzneib. und eine Methode der quant. mikr. Analyse, Arch. d. Pharm., 1908, CCXLVI, S. 523 und Grundlagen und Methoden f. d. mikr. Unters. v. Pflanzenpulvern, sowie bei G. Bredemann, Die quant. mikr. Bestimmung d. Brandsporen (Tilletia-Sporen) in Mehl, Kleie und Getreide, Landw. Versuchsstat., 1911, LXXV, S. 135.

[2]) E. Chr. Hansen, Über das Zählen mikroskopischer Gegenstände in der Botanik, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, S. 203. — O. Linde, Zur Untersuchung des Kosoblütenpulvers, Apoth.-Ztg., 1911, 26, S. 136.

ausgezählt werden sollen, in der Regel schwierig ist, bringt man sie in Kammern, die dadurch hergestellt werden, daß auf einen Objektträger ein Ring, eine Lochplatte oder ein viereckiger Rahmen aufgekittet[1]) oder noch besser aufgeschmolzen und dann so abgeschliffen werden, daß eine bestimmte Kammertiefe entsteht (z. B. 0,01; 0,02; 0,1; 0,5, auch 1 und mehr mm). Der Boden der Kammer wird mit einer geeigneten Netzteilung versehen (Fig. 26). Sie wird je nach der Feinheit und Anzahl der Teilchen verschieden gewählt werden. Die optischen Werkstätten führen regelmäßig Kammern mit Netzteilungen verschiedener Art. Bei den für die Blutkörperzählungen bestimmten Kammern geht die Flächenteilung bis auf $^1/_{400}$ qmm herunter. Solche Kammern dienen gleichzeitig zum Messen des Volumens der ausgezählten Flüssigkeit. Mit der Auszählung ist nämlich so lange zu warten, bis die in der Flüssigkeit suspendierten Teilchen zu Boden gesunken sind. Erst dann, wenn sie dort nebeneinander liegen, kann man sie zählen. Die in einem Felde der Netzteilung liegenden Teilchen entstammen der über diesem Felde stehenden Flüssigkeitsschicht. Da deren Höhe durch die Kammertiefe bekannt ist, so ist aus der Größe des Feldes sofort das Volumen dieser Flüssigkeitsschicht zu ermitteln. Die Felderteilung schwankt in ihrer Gesamtgröße zwischen 1 qmm und 16 qmm. Das Auszählen kann so, genügende Genauigkeit der Kammertiefe vorausgesetzt, ohne Schwierigkeiten ziemlich genau erfolgen[2]). Besitzt die Kammer selbst keine Netzteilung, so muß diese durch ein Okularnetzmikrometer ersetzt werden. Diese werden, wie die Okularmikrometer, als runde Plättchen zum Einlegen in einstellbare Okulare hergestellt und besitzen Netzteilungen, deren Felder in der Regel eine Seitenlänge von ½ oder 1 mm haben. Wie bei den Okularmikrometern ist der Wert dieser Felderteilung, auf das Objekt bezogen, abhängig von dem benutzten Objektiv, der angewandten Tubuslänge und dem Okular. Die Okularmikrometer sind also auch mit einem Objektmikrometer vor der Benutzung zu eichen. Sollen sämtliche in der Kammer niedergeschlagenen Teilchen gezählt werden, so ist hier besondere Aufmerksamkeit darauf zu richten, daß einzelne Teilchen nicht übersehen oder mehrfach gezählt werden. Auf der anderen Seite ist es leichter, auch etwaige am Deckglas haftende Teilchen mit zu berücksichtigen, indem man nach Auszählen des Bodens der Kammer auch auf die Unterseite des Deckglases einstellt. Grundsätzlich sind diese Methoden auch auf kolloidale

---

[1]) C. Hartwich u. A. Wichmann, Einige Beobachtungen an Stärkekörnern und über die Zählkammer, ein Hilfsmittel zur quantitativen Ermittelung von Verfälschungen vegetabilischer Pulver, Arch. d. Pharm., 1912, CCL, S. 452.

[2]) Curt Kühn, Über den Wert der Zählung feinkörniger Substanzen, Zeitschr. f. angew. Chem., 1916, 28, S. 126.

Verteilungen anzuwenden, doch muß die Schichtdicke dann so gewählt werden, daß die ganze Schicht des Präparates auf einmal übersehen werden kann und die Konzentration der Flüssigkeit so gering ist, daß in dem abgegrenzten Felde eine solche Anzahl von Teilchen vorhanden ist, daß man sie mit einem Blick übersehen kann, weil die Bewegung der Teilchen sonst das Auszählen verhindern würde.

Der Mikromanipulator

Zu einem sehr wichtigen Hilfsmittel bei der biologischen Forschung entwickelt sich die Mikrurgie. Sie gibt dem geschulten Forscher und geschickten Arbeiter eine Methode, die es ihm ermöglicht, auch bei sehr kleinen mikroskopischen Objekten durch zweckmäßige Eingriffe Veränderungen hervorzurufen, deren Studium ihm den Einblick in den inneren Zusammenhang und die Wirkungsweise der Zellbestandteile erleichtert. Freihändige Zelloperationen sind keine Seltenheiten, doch beschränken sie sich auf größere Zellen, die mit schwachen Vergrößerungen, wie sie den Präpariermikroskopen eigen sind, beobachtet werden können. Um aber bei höhe- und bei umgekehrtem Bild des Objektes präparieren zu können, sind einmal Werkzeuge nötig, die außerordentlich viel feiner als die üblichen von der Mechanik zur Verfügung gestellten sind (Mikroinstrumente), und zweitens mechanische Einrichtungen, die diese verfeinerten Instrumente in der gewünschten Weise und mit genügender Sicherheit zu führen gestatten. Diese mechanischen Einrichtungen bilden den eigentlichen Mikromanipulator. Es wird aber bei starken Vergrößerungen der Abstand zwischen Objektiv und Präparat so gering, daß es nicht gelingen würde, selbst die aufs äußerste verfeinerten Instrumente an das Präparat heranzubringen. Es ist daher für diese Arbeiten das Präparat in geeigneter Weise an der Unterseite des Deckglases statt auf einem Objektträger zu befestigen und unter ihm ist genügender Platz für die Führung der Instrumente zu lassen. Man arbeitet deshalb in einer besonderen Feuchtkammer, in die die Mikroinstrumente seitlich

Fig. 27. Mikromanipulator nach Janse und Péterfi

eingeführt werden, im hängenden Tropfen von mehr oder minder großer Ausdehnung.

Seit den ersten Arbeiten dieser Art, die auf Schouten[1]) und Barber[2]) zurückgehen, ist die Entwicklung mehrere Wege gegangen. Die Fig. 27 stellt die Weiterentwicklung des Schoutenschen Apparates dar, der als Mikromanipulator nach Janse und Péterfi vom Zeisswerk in Jena hergestellt wird. Er hat die mechanischen Einrichtungen zur Führung der Mikroinstrumente an besonderen Hilfsstativen frei neben dem Mikroskop. Die Hilfsstative, von denen in der Regel 2, je 1 rechts und links vom Mikroskoptisch, gebraucht werden, sind auf einer Grundplatte befestigt, auf der auch das Mikroskop fest aufgestellt wird. Dadurch erhält der Beobachter eine größere Freiheit in der Handhabung der Instrumente und der Ausnutzung des Mikroskopes, als wenn die Mikroinstrumente am Mikroskoptisch selbst befestigt werden. Jedes der Hilfsstative ist mit sechs Schrauben für die Betätigung der notwendigen Bewegungen versehen. Zwei Schrauben dienen für die grobe Seiten- und Höhenverstellung, die anderen vier bewirken die Feinverstellung in diesen Richtungen bzw. in der Richtung von vorn nach hinten und in diagonaler Richtung. So ist eine genaue, gleichmäßige Bewegung in allen Richtungen des mikroskopischen Sehfeldes gewährleistet. Die Mikroinstrumente werden von der Seite in die Kammer eingeführt. Bei schwachen Vergrößerungen läßt sich auch ohne Feuchtkammer auf einem Objektträger arbeiten. Es kann im Hell- und Dunkelfelde und unter anderen besonderen Bedingungen gearbeitet werden. Die für den besonderen Zweck geeigneten Mikroinstrumente müssen vom Beobachter selbst aus Glasröhren, feinen Metallsplitterchen und anderem Hilfsmaterial hergestellt werden, soweit sie nicht als größere Normalinstrumente zweckmäßiger mit dem Apparat mitgeliefert werden. Die Gebrauchsanweisung der Firma Zeiss, Druckschrift Mikro 374, und die Arbeiten von Péterfi und seiner Schule geben weitere Auskunft. Es seien hier nur einige Arbeiten angeführt:

T. Péterfi, Die mikrurgische Methodik. Hdb. d. biol. Arbeitsmeth. von Abderhalden, Abt. V, Teil 2, S. 479, 1924.

T. Péterfi, Die Technik der Zelloperationen (Mikrurgie), Methodik der wiss. Biologie von T. Péterfi, I. Bd., S. 559, 1928.

[1]) S. L. Schouten, Reinkulturen aus einer unter dem Mikroskop isolierten Zelle. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 1905, 22, S. 10.

[2]) M. A. Barber, *The pipette method in the isolation of single microorganisms* and in the inoculation of substances into living cells, Referat in Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 1915, 32, S. 82.

E. A. Hauser, Über die Anwendung des mikrurgischen Verfahrens in der Kolloidchemie, Kolloid-Zeitschrift 1926, 38, S. 76.

W. Seifriz, Observations on some physical properties of protoplasm by aid of microdissection, Ann. of botan. 1921, 35, S. 269.

Dauerpräparate und ihre Anfertigung

In der Mikrochemie besitzen die Dauerpräparate nicht die gleiche Bedeutung wie in der Anatomie. Frisch hergestellte Präparate sind im allgemeinen vorzuziehen, besonders dann, wenn Fällungen und Niederschläge in den Zellen lokalisiert sind. Damit soll die Bedeutung der Dauerpräparate für mikrochemische Zwecke keineswegs in Abrede gestellt werden, in vielen Fällen werden sie von Wert sein. Die folgenden Zeilen sollen nur dem Anfänger einige Hinweise geben. Wir unterscheiden bei der Anfertigung der Dauerpräparate: die Vorbehandlung der Präparate, den Einschluß sowie den Verschluß (Zukitten) und Signierung. Anschaffung von Hilfsapparaten ist nicht erforderlich, die nötigen Lösungen kann man auch von Grübler-Leipzig beziehen.

Die **Vorbehandlung** hat den Zweck, die Präparate geeignet für das zu wählende Einschlußmedium zu machen. Zarte Präparate, die in konzentriertes Glyzerin oder Glyzeringelatine eingeschlossen werden sollen, erleiden beim direkten Übertragen aus Wasser in diese Medien häufig Schrumpfungen. Daher saugt man zunächst das Wasser ab, fügt verdünntes Glyzerin zu und läßt die Objektträger (ohne Deckglas) an einem vor Staub geschützten Orte (unter einer Glasglocke) bis zur Vollsaugung mit Glyzerin liegen. Chloralpräparate müssen vor dem Einschließen in Glyzeringelatine mit Glyzerin behandelt werden. Über die Vorbereitung für Balsampräparate s. S. 48. Bei Trockenpräparaten ist eine Vorbereitung bei Sublimaten gewöhnlich nicht erforderlich, bei Fällungen müssen die Mutterlaugen möglichst entfernt werden. Zu diesem Zwecke wird mit einem fein zugespitzten Streifen Fließpapier die Mutterlauge sorgfältig abgesaugt, dann mit etwas Wasser oder verdünntem Weingeist ausgewaschen und die Waschflüssigkeit ebenfalls abgesaugt. Die Wahl der Waschflüssigkeit richtet sich naturgemäß nach der Natur der Kristalle. Die ausgewaschenen und abgesaugten Präparate werden unter der Glasglocke einige Zeit zum völligen Austrocknen liegen gelassen.

Der **Einschluß** erfolgt in Flüssigkeiten oder in Luft (Trockenpräparate). Die Wahl des Einschlußmediums ist von der Natur des Objektes abhängig (gefärbte oder ungefärbte Objekte, bei Kristallen die Löslichkeitsverhältnisse, die Brechungsexponenten von Objekt und Medium u. a.). Die besten Einschlußmedien sind entschieden Glyzeringelatine und von den Balsamen der Kanadabalsam.

Von dem früher vielfach üblichen und sonderbarerweise auch jetzt noch hier und da empfohlenen Einschließen in Glyzerin sieht man am besten ganz ab, denn Glyzerin weist gegenüber der Glyzeringelatine keine Vorteile, wohl aber mannigfache Nachteile auf. Glyzerin (konzentriert, mit gleichen Teilen Wasser verdünnt, oder mit Essigsäure schwach angesäuert) zieht die meisten Farbstoffe nach längerer Zeit aus, gewährt den Objekten im Präparate keinen festen Halt und gestaltet den Verschluß langwierig. Glyzerinpräparate dürfen nicht senkrecht aufbewahrt werden, da die Objekte sonst heruntersinken und dabei, falls sich mehrere in einem Präparate befinden, durcheinander geraten. Man begegnet zuweilen der Angabe, daß das Einschließen in Glyzerin das einfachste Verfahren wäre; es gestatte die Präparate ohne Übertragung, also unter dem gleichen Deckglase, unter dem man die Reaktion vorgenommen, einzuschließen, indem man Glyzerin durchsaugt, den Deckglasrand ordentlich trocknet und mit Asphaltlack verschließt (der gleiche Erfolg läßt sich jedoch bequemer mit Glyzeringelatine erreichen). Reinigung und Verschließung sind bei den lose liegenden Deckgläschen der Glyzerinpräparate recht schwierig[1]). Von über 80 auf obige Weise 1898 hergestellten Präparaten haben sich bis 1913 nur einige wenige gut gehalten, bei der Mehrzahl war der Lack mehr oder weniger tief unter das Deckglas eingedrungen. Ist man gezwungen, Glyzerin als Einschlußmittel anzuwenden, so muß zuerst auf dem Objektträger aus Xylol-Kanadabalsam (gleiche Teile käuflicher Balsam und Xylol oder Chloroform) mit einem fein zugespitzten Holzstäbchen (Zahnstocher, Streichholz) oder einem dünnen Glasstäbchen ein Rahmen gezogen werden, der einen etwas größeren Umriß als das benutzte Deckglas besitzt und an einer Stelle nicht völlig schließt. Ist der Balsamrahmen etwas eingetrocknet, so wird er mit Glyzerin erfüllt und die Objekte werden eingelegt. Schließlich wird das Deckglas von einer Seite aus auf den Rahmen gelegt und etwas angedrückt, wobei das überschüssige Glyzerin durch die offene Stelle des Rahmens austritt und entfernt wird. Dann schließt man die offene Stelle des Rahmens mit Xylolbalsam und nun erst wird der Verschluß angebracht.

Am bequemsten ist das Einschließen in Glyzeringelatine[2]). Diese eignet sich für viele Kristallfällungen (Hesperidin, Scutellarin,

---

[1]) Zum Umranden von Glyzerinpräparaten füllt man die Ränder des Deckglases, unter dem sich das Glyzerin im Überschuß befindet, mit Traganthpulver ziemlich dick auf und schneidet die Ränder des nach einigen Tagen gebildeten Kitts mit scharfem Messer gerade. Dann überzieht man mit erhitztem Wachs und nach dessen Erstarren mit Deckglaslack. — K. Neumann u. J. Hueber, Verbesserte Methode zum Umranden von Glyzerinpräparaten, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1927, XLIV, S. 332.

[2]) 7 g Gelatine (fein zerschnitten) werden mit 42 ccm Wasser über Nacht quellen gelassen, dann werden 50 ccm Glyzerin und 1 g Phenol zugefügt; die Mischung wird unter Umrühren bis zum Verschwinden der Trübung erwärmt und noch warm durch ein feines zwischen den Fingern geriebenes Leinwandläppchen in eine passende Deckelkruke koliert. Bei Bedarf wird das nötige Quantum der erstarrten Masse entnommen. Man kann auch die kolierte Masse auf einen Teller in dünner Schicht ausgießen. Die erstarrte Schicht schneidet man „in kleine

Osazone) und manche Färbungen. Von der festen Gelatinemasse[1]) wird das erforderliche Quantum auf dem Objektträger durch gelindes Erwärmen verflüssigt und die Flüssigkeit in annähernder Deckglasgröße mit der Nadel flach gestrichen, wobei sich etwaige Luftbläschen leicht entfernen lassen. In die noch flüssige Gelatine werden die Präparate vom Rande her eingeschoben und nebeneinander möglichst in der Mitte des Tropfens angeordnet. Dann wird das einige Male durch die Flamme gezogene Deckglas von einer Seite aus aufgelegt und angedrückt. Das Auflegen des Deckglases geschieht am sichersten mit einer Spatelpinzette. Das Andrücken geschieht hier und bei den Balsampräparaten am schonendsten und zweckmäßigsten durch Aufsetzen von kleinen, mit Griff versehenen Gewichten (5 g für das Deckglasformat 18/18, 8 g für das Format 26/26 mm und 10 g für das Format 24/32 mm).

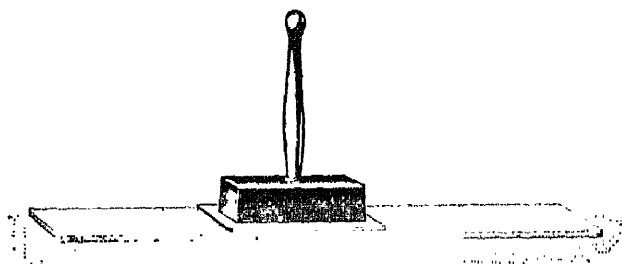



Fig. F. Gewicht mit Griff zum Aufpressen der Deckgläser

Das Verfahren Edingers der Einschließung in Gelatine (Neurol. Zentralbl. 1913, XXXII, S. 927) ist auch bei pflanzlichen Schnitten von Vorteil, wenn die Durchtränkung mit der Gelatine gründlich ausgeführt wird und das Austrocknen langsam bei etwa 30° erfolgt. Die Anilinfarben halten sich nicht[2]).

Überschüssige Gelatine tritt beim Andrücken des Deckglases aus und wird erst nach völligem Erstarren mit dem Messer abgeschnitten

Würfelchen von ausprobierter, je einen flachen Tropfen bildender Größe" (Ed. Strasburger, Praktikum, 2. Pensum, auch A. Zimmermann, Mikrotechnik). Die Würfelchen werden zum Bedarf in einem verschlossenen Gefäße vorrätig ge-
Doch scheint hiermit kein Vorteil gegeben zu sein, denn die Menge der
e richtet sich nach der Beschaffenheit (Größe und Dicke) und der Anzahl der Präparate, wechselt somit von Fall zu Fall.

[1]) Andere bringen einen Tropfen der zuvor flüssig gemachten Gelatine auf den Objektträger. Dann wird entweder das Gefäß mit der Gelatine in warmes Wasser genügend lange eingestellt oder, wie es W. Behrens macht, der die Gelatine in Reagenzgläsern aufbewahrt, nur der obere Teil des Inhaltes über der Flamme geschmolzen. Durch den flüssig aufgetragenen Gelatinetropfen sollen Luftblasen vermieden werden (W. Behrens, Leitfaden der botan. Mikroskopie 1890, S. 171). Abgesehen davon, daß dieses Ziel nicht in erwünschtem Maße erreicht wird, verliert nach eigener Erfahrung die Masse durch das häufige Erwärmen ihr schnelles Erstarrungsvermögen und wird bräunlich.

[2]) H. Schneider, Mikrotechnische Mitteilungen, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1916, XXXIII, S. 248.

Hat man zu wenig Gelatine genommen, dann füge man nicht gleich neue hinzu, sondern erwärme zunächst das Präparat nochmals und halte es kurze Zeit etwas schräg, damit die Masse sich nach der leeren Stelle hinziehen kann. Neue Masse setze man erst hinzu, wenn es sich nach dem Anpressen des Deckglases als unbedingt nötig erweist. Man bringt dann mit der Nadel etwas feste Gelatine an den Deckglasrand und erwärmt das Präparat gelinde. Dadurch tritt die zugesetzte Masse unter das Deckglas ein, ohne daß man dieses abzuheben braucht. — Gilt es sehr zarte Objekte einzuschließen, die ein Abheben des Deckglases oder gar ein Übertragen nicht zulassen, so bringt man nach vorsichtigem Durchsaugen von verdünntem Glyzerin an den Deckglasrand etwas Glyzeringelatine, die man unter Anwendung von gelinder Wärme unter das Deckglas einsaugt. Sind störende Luftblasen entstanden, so entfernt man diese, indem man das Präparat nochmals erwärmt oder es längere Zeit auf einer warmen Platte (Ofen) liegen läßt. Oft gelingt es, die Schnitte aus Luftblasen an den wieder flüssig gemachten Präparaten durch ein unter das Deckglas geschobenes Roßhaar oder einer Schweinsborste herauszubringen oder die Blasen an den Rand zu schieben. Derart lassen die Schnitte sich auch zurechtrücken, falls sie beim Auflegen des Deckglases übereinander oder zu nahe dem Deckglasrande gekommen sind. — Kleine Objekte (Pollenkörner[1]), Stärke, Trichome) dringen beim Auflegen des Deckglases meist bis an den Deckglasrand vor, wenn man sie in die flüssig gemachte Gelatine eingetragen hat. Um dieses zu vermeiden, breitet man den flüssigen Gelatinetropfen in Deckglasgröße auf dem Objektträger aus, läßt ihn erstarren, bringt auf die Mitte desselben die Objekte, legt das Deckglas auf und verflüssigt jetzt vorsichtig die Gelatine. Auf diese Weise bleiben selbst sehr kleine Objekte im Gesichtsfelde. — Der Verschluß wird erst nach einem Jahre angebracht. Präparate von Drogen, 1892 mit Glyzeringelatine bereitet, waren 1913 noch von tadelloser Beschaffenheit.

Glyzerin-Gelatine-Präparate kann man nach Klemm[2]) auf folgende Weise haltbar machen: Man bringt die Präparate nach dem Erstarren der Gelatine in eine Petrischale, in die man gleichzeitig einige Gramm von Trioxymethylen in dünnes Seidenpapier eingeschlagen bringt. Läßt man die Schale einige Tage in einem Wärmeschrank bei einer Temperatur, die 2—3° unter dem Schmelzpunkt der Gelatine liegt, so entwickeln sich aus dem Trioxymethylen Formaldehyddämpfe, die die Gelatine am Rand des Deckglases härten.

---

[1]) Pollenkörner betrachtet man nach Coupin am besten in Vaselinöl.

[2]) E. Klemm, Eine einfache Methode zum Haltbarmachen von Glyzerin-Gelatine-Präparaten. Mikrokosmos 1917/18, XI, S. 45.

Ein Einschlußmittel, dessen Lichtbrechung der des konz. Glyzerins und der Glyzeringelatine gleichkommt, hat Bálint[1]) angegeben. Die Objekte schrumpfen in dem Gummi-Zucker-Gemisch[2]) nicht; auch soll eine Lackumrandung nicht erforderlich sein. Die Schnitte müssen vor dem Einbetten Glyzerin passiert haben. — In gleicher Weise wird das Apáthysche Gemisch benutzt (Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1892, IX, S. 37; gleiche Teile Gummi arabicum, Rohrzucker und Wasser mit 0,01 % Thymolzusatz). Bei zarten Objekten wird die Mischung mit Wasser verdünnt benutzt; nach dem Einlegen der Objekte läßt man die Präparate an der Luft eindicken.

Gummi arabicum wird vielfach zum Einschließen verwandt, so in folgenden von Coupin[3]) empfohlenen Einschlußmitteln.

Glykose-Gummi mit Sublimat: Sublimatlösung (0,8—1 proz.) 35 ccm, Gummi arabicum 30 g, Glykose 10 g. Wenn nötig, durch Gaze seihen. Die Präparate können nach einem Tag mit Asphaltlack oder Paraffin u. dgl. umzogen werden.

Thymol-(Formol-)Gummi: Wasser 10 ccm, Gummiarabicum 10 g, Glykose 5 g, dazu ein Kriställchen Thymol oder einige Tropfen Formol. Eignet sich besonders für Flächenschnitte, aber wie die erste Lösung auch für viele andere Gegenstände, wie Haare, Stärkekörner, Fasern usw.

Kupfer-Gummi: Sublimatlösung (0,6—0,8 proz.) 35 ccm, Glykose 10 g, Gummi arabicum 30 g, ammoniakalisches Chlorkupfer 1 g. Eignet sich für Fadenalgen.

Für Fadenalgen empfiehlt Coupin außerdem Kupfer-Gelose: Sublimatlösung (0,4 proz.) 500 ccm, Gelatine 5 g, ammoniakalisches Chlorkupfer 1 g. Heiß zu lösen.

Klemmsches Einschlußmittel[4]): Die Lösung von 25 g Gummi arabicum in 50 g Wasser wird mit 5 ccm Formalin versetzt.

Wenig empfindliche Gegenstände überträgt man direkt aus Wasser oder verdünntem Weingeist, zum Schrumpfen neigende der Reihe nach

[1]) S. Bálint, B[illegible] Notizen, [illegible] f. wiss. Mikr., 1910, XXVII, S. 243.

[2]) Gummi arabicum 40, Rohrzucker 60, Wasser zur Lösun[illegible] 10 g und je 10 ccm Eisessig, Glyzerin und Laktophenol. Die [illegible]e Gummilösung wird mit der Zuckerlösung und dem Kaliumazetat [illegible]ischt und die Mischung auf dem Wasserbade eingedickt (bis zur Hautbildung) dann mit den anderen Bestandteilen versetzt und in weithalsige Gläser gefüllt. Der entstandene Schaum wird durch Einstellen des Gefäßes in warmes Wasser entfernt.

[3]) H. Coupin, Sur le montage de quelques préparations microscopiques, Rev. génerale de Botanique, 1919, XXXI, S. 109.

[4]) E. Klemm, Ein gutes Einschlußmittel für mikroskopische Objekte, Mikrokosmos 1917/18, XI, S. 111.

aus Wasser je eine halbe bis ganze Stunde in eine 5-, 10-, 20proz. Verdünnung der Lösung und dann erst in diese. Überführung aus starkem Weingeist nicht durchführbar. Lackring überflüssig.

Hoyersche Einschlußflüssigkeit für Anilinfarben:

Eine Lösung von 1 Teil arabischem Gummi in 2 Teilen Leitungswasser wird mit Kaliumazetat versetzt und auf dem Wasserbad bis zur Sirupskonsistenz eingeengt. Die Lösung muß so konzentriert sein, daß sie nach Bedeckung mit dem Deckglas bald fest wird. Bei richtiger Konsistenz ist eine Lackumrandung überflüssig.

Als Einschlußmittel für Diatomeen empfehlen Kolbe u. Wislouch[1]) Piperin-Cumaron. Man schmilzt zuerst Piperin und setzt dann die gleiche Gewichtsmenge Cumaron unter fortwährendem Umrühren allmählich hinzu. Nach vollständigem Schmelzen erhitzt man unter beständigem Rühren weiter, bis sich eben Gasblasen zu bilden beginnen und gießt die bis etwa zur zähflüssigen Konsistenz abgekühlte Masse auf ein kleines Eisenblech in einzelnen Tropfen aus. Zur Erzielung eines höheren Brechungsindex kann man der flüssigen Masse unter sorgfältigem Umrühren etwa $^1/_{30}$ (des Gesamtgewichts der Masse) rotes Quecksilberjodid hinzufügen. Dunkel aufzubewahren.

Zur Herstellung von Dauerpräparaten schmilzt man eine kleine Menge der Masse über kleiner Flamme auf dem Objektträger. Darauf wird das Deckglas mit der aufgetrockneten Diatomeen-Auftragung über derselben Flamme kurz, aber intensiv erhitzt und noch warm auf den ebenfalls noch warmen Tropfen der Masse mit der Schicht nach unten aufgelegt; durch rasches Erhitzen von beiden Seiten verflüssigt man die Masse und rückt, ehe sie fest wird, das Deckglas so zurecht, daß es genau in die Mitte des Objektträgers kommt.

Kanadabalsam[2]) ist ein vorzügliches Einschlußmittel; es wird überwiegend für farbige Kristalle und ganz allgemein bei Mikrotom-

---

[1]) R. W. Kolbe, Über Einschlußmittel für Diatomeen, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1927, XLIV, S. 196; die vorschriftsmäßig hergestellte Masse kann unter dem Namen Diatomeen-Einschluß-Medium nach Kolbe u. Wislouch von P. Altmann, Berlin NW 6, Luisenstr. 47, bezogen werden.

[2]) Es ist ratsam, eine Xylollösung von festem Kanadabalsam zu benutzen, der frei von bleichendem Terpentinöl ist und besser erhärtet. Fester Balsam wird gepulvert in viel Xylol gelöst, die Lösung wird filtriert, das Filtrat durch freiwilliges Eindunsten zur Sirupkonsistenz gebracht und die Masse, „Xylol-Balsam", in Tuben gefüllt. Vorteilhaft bezieht man die Balsamlösungen von Grübler-Leipzig, die saure Balsamlösung ist für Färbungen mit Hämatoxylin und sauren Farbstoffen, die neutrale, die vor Licht und Luft geschützt werden muß, ist für Präparate, die mit basischen oder neutralen Farbstoffen gefärbt sind (nach O. Linde, Die Darstellung pharmakognostischer Dauerpräparate, Apoth.-Ztg., 1910, XXV, S. 837). — Kanadabalsam wurde zuerst 1883 von Hillhouse empfohlen.

schnitten gebraucht, die infolge ihrer Vorbehandlung besonders hierzu geeignet sind. Die Präparate erhärten allerdings selbst bei mäßiger Wärme erst nach mehreren Tagen (bei Zimmertemperatur erst nach Wochen), zeichnen sich aber durch große Haltbarkeit aus. Vor allem achte man darauf, nicht zuviel Balsam zu nehmen. Durchs Beschweren des Deckglases mit geeigneten Gewichten, die mit einem Griff versehen sind, kann der überschüssige Kanadabalsam ohne Beschädigung der Präparate am Deckglasrande ausgepreßt werden (5 g Gewichte sind für Deckgläser von 18×18 mm Kantenlänge zu verwenden; 8 g für solche von 21×26 mm und 10 g für solche von 24×32 mm. Der am Deckglasrand vorquellende überschüssige Kanadabalsam ist vor dem Erhärten mit einem xylolgetränkten Pinsel zu entfernen. Kanadabalsam ruft oft gute Differenzierungen der Färbungen hervor und hellt die Präparate stark auf. Aber gerade das starke Aufhellungsvermögen (n=1,54) macht den Balsam für zarte und ungefärbte Objekte, wie Stärke, verschiedene Zellmembranen, Diatomeen u. a. weniger geeignet. In solchen Fällen greift man zu anderen Balsamen, so zum venetianischen Terpentin[1]) (auch anwendbar bei Safranin-, Carmin-, Hämatoxylinfärbungen), zum Dammarharz[2]) (n=1,50, Teerfarben, farblose Kristalle), Styrax[3]) (n=1,58, Diatomeen), Metastyrol[4]) (n=1.58, Kristalle), Tolubalsam[5]) (n=1,64), α-Monobromnaphthalin (n=1,66, Diatomeen) u. a.

Die Entfärbung der in Kanadabalsam eingeschlossenen Präparate kann man durch Fernhaltung des Luftsauerstoffs verhindern. Man zieht nach 1—2 Tagen um den Deckglasrand einen allseitig gut schließenden Ring von reinem, hochschmelzendem Paraffin und zieht über den Paraffinrahmen einen kräftigen Lackring, der innen und außen über ...n übergreift[6]).

[1]) 100 g venetianischer Terpentin wird mit 100 ccm Weingeist in lose bedeckter Flasche 3 Wochen lang unter Umschütteln mazeriert, bis eine hellgelbe Lösung resultiert. Die Lösung wird nur sehr langsam fest (Vosseler, Venetianisches Terpentin als Einschlußmittel für Dauerpräparate, Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., 1889, VI, S. 292).

[2]) Mehrtägige Mazeration von gleichen Teilen Dammar, Terpentinöl und Benzol; die Lösung wird abgegossen, filtriert und das Filtrat bis zur Sirupkonsistenz der Verdunstung überlassen. Bei Xylol-Dammar *muß* Xylol *in mehrfacher Menge* zur Lösung genommen werden (Behrens-Küster, Tabellen 1908, II. Behrens, Mikrochemische Technik, 1900).

[3]) 100 g Styrax in 100 g Chloroform gelöst, die filtrierte Lösung, mit 1000 ccm versetzt, bis zur Sirupkonsistenz eindunsten lassen.

[4]) Metastyrol ist eine farblose Flüssigkeit.

[5]) Eine eingedickte Lösung von 100 g Tolubalsam in 300 g Chloroform.

[6]) K. John, Über die Verhütung der langsamen Entfärbung der in Kanadam eingeschlossenen Präparate, Zeitschr. wiss. Mikrosk. 1928, XLV, S. 482.

Zu außergewöhnlich großen und dickeren Schnitten eignet sich Gelatine nicht so gut wie Balsam. Die Schnitte werden mit Glyzerin völlig durchtränkt, oberflächlich zwischen Fließpapier abgetrocknet, dann auf dem Objektträger in einen hinreichend großen Tropfen von dünnflüssigem Xylol-Kanadabalsam gebracht, die Luftblasen durch vorsichtiges Erwärmen entfernt und schließlich in Balsam eingeschlossen. Dünne Objektträger dienen als Deckgläser[1]).

Als Einschlußmittel namentlich für Gegenstände mit hohem Brechungsindex eignet sich nach Hanna[2]) das Kunstharz AFS. (Brechungsindex 1,68—2,0). Anwendung wie Kanadabalsam oder nach Verdünnung mit Anilin oder anderen Lösungsmitteln.

Rondeau du Noyes[3]) empfiehlt folgendes Einschlußmittel: Man erhitzt 20 g wasserfreies Lanolin vorsichtig (am besten auf einer Metallplatte) zum Schmelzen und setzt — nach Verschwinden des von Spuren Wassers herrührenden Schaumes — 80 g zerkleinertes Kolophonium hinzu. Man erhitzt, bis die Flüssigkeit völlig klar und homogen ist und gießt dann in Metallschachteln.

Trockenpräparate sind bisher in der Pflanzenmikrochemie wenig beachtet und nur zur Aufbewahrung von Aschenskeletten empfohlen worden. Mit der Einbürgerung der Mikrosublimate kommt den Trockenpräparaten eine größere Bedeutung zu. Die Einbettung ist sehr einfach. Die lufttrockenen Sublimate oder Niederschläge (S. 96) werden mit dem Deckglase bedeckt und dieses mit Wachs oder Paraffin umrandet. Beide Stoffe lassen sich in geschmolzenem Zustande mit einem zugespitzten Hölzchen oder einem feinen Pinsel auftragen. Man kann auch von beiden Stoffen größere feste Stücke vorrätig halten; bei Bedarf nimmt man eine auf einen Flaschenkork (als Handgriff) gesteckte Haarnadel, die man am Knie erhitzt und heiß in die Stücke einsticht. Das an der Nadel haftende flüssige Wachs wird dann aufgetragen. Liegen zarte Objekte vor, die durch das Deckglas zerdrückt werden können, so zieht man zunächst auf dem Objektträger einen Stützrahmen aus Wachs, auf den das Deckglas zu liegen kommt, welches nochmals umzogen wird. An Stelle des Wachsrahmens lassen sich Rahmen von Schreibpapier verwenden (in Form der Pappdeckel zur feuchten Kammer, doch nur von Deckglasgröße). Der Rahmen wird in Wasser etwas eingeweicht, zwischen Fließpapier abgepreßt, mit flüssigem Leim[4]) ge-

---

[1]) H. Schenk, Über Einschließen von größeren Schnitten zur Herstellung von Demonstrationspräparaten, Bot. Centralbl. 1893, LIV, S. 1.

[2]) G. D. Hanna, „AFS." a new resin of high refractive index for mounting microscopic objects. Science 1927, LVX, S. 41.

[3]) Rondeau du Noyes, Nouveau lut pour préparations microscopiques, Compt. rend. soc. biol. 1918, LXXXI, S. 741.

[4]) Als Leim empfiehlt F. Emich (Mikrochemie 1911, S. 203 u. 158) „Wiscin" von Th. Schroeter, Leipzig-Connewitz.

tränkt und der Überfluß des Klebstoffes durch Pressen zwischen zwei Objektträgern entfernt. Nun wird der Rahmen, dann das Deckglas aufgelegt und letzteres durch Kork und ein größeres Gewicht (200 g) angepreßt.

Einen **Verschluß** pflegt man bei allen nicht in Balsam eingeschlossenen Präparaten anzubringen. Präparate, die in einem flüssig bleibenden Medium eingebettet sind, müssen sofort luftdicht verkittet werden, damit die Flüssigkeit nicht verdunsten kann. Wie bei Glyzerinpräparaten benutzt man bei Metastyrol u. a. hierzu Kanadabalsam. Zunächst bringt man einen schmalen Verschlußstreifen an, und nachdem dieser eingetrocknet ist, umzieht man nochmals. Ein guter Verschluß muß auf allen Seiten gleich stark sein und gleich weit auf Deckglas und Objektträger übergreifen. Gelatinepräparate dagegen erhalten erst nach 6—9 Monaten einen Lackverschluß[1]). Verschlußlacke sind in großer Zahl empfohlen worden. Wenn auch die Herstellung der meisten nicht mühevoll ist, so ist es vorteilhafter, sie gebrauchsfertig zu beziehen. Am meisten gebraucht wird Asphaltlack (115 g Asphalt, 120 g Leinöl, 260 g Terpentinöl) und Maskenlack.

Nach Migula sind Asphalt- und Maskenlack nicht zu empfehlen. Am besten ist der japanische Mikroskopierlack (Firma Max Troplowitz in Eisenach), der nach Erhärtung an der Luft in allen Lösungsmitteln unlöslich ist. Auch schwarzer Bernsteinlack und der Heydenreichsche Bernstein-Kopallack sind brauchbar.

Als Deckglaskitt empfiehlt Plaut[2]) rektifizierten auf dem Sandbad eingedickten venetianischen Terpentin, zu dessen Auftragung am besten die Präparatenkanne verwendet wird.

Duenan[3]) umrahmt zuerst mit warmer Gelatinelösung, bepinselt diese gründlich mit einer starken Lösung von Kaliumdichromat und belichtet eine Stunde lang gut; zuletzt kommen 2 oder 3 Anstriche mit einem Deckglaskitt aus je 15 Tropfen bestem Asphaltlack, bestem Marineleim und 3 Tropfen Rizinusöl.

Aufbewahrung und Beschriftung. Zur Aufbewahrung fertiger Präparate verwendet man heute ganz allgemein eigens dazu her-

[1]) Diese Präparate erhalten eine vorläufige Bezeichnung, d. h. die nötigen Daten werden mit schwarzer Tusche von Günther Wagner-Hannover-Wien direkt auf den Objektträger geschrieben. Die Tusche trocknet sehr schnell, haftet fest am Glase und verträgt trockenes Abwischen.

[2]) M. Plaut, Eine Präparatenverschlußkanne; Venetianischer Terpentin als Deckglaskitt. Ztschr. wiss. Mikrosk., 1913, XXX, S. 476. Mit Fettfarbstoffen gefärbte Terpentinkitte usw. Ber. deutsch. bot. Ges. 1915, XXXIII, S. 133.

[3]) F. M. Duenan, Some methods of preparing marins specimens. Ref. in Ztschr. wiss. Mikrosk., 1923, XL, S. 325.

Mappen oder Kassetten. Präparate mit flüssigen Einschlußmitteln oder solche, bei denen dasselbe noch nicht erhärtet ist, lassen sich am besten liegend in flachen Mappen aufbewahren. Präparate mit festen Einschlußmitteln dagegen sind am zweckmäßigsten in Kassetten zu verwahren, wo sie zwischen Zahnleisten eingestellt werden.

Nach Fertigstellung der Präparate sind dieselben sofort zu beschriften. Auf Präparate mit kleinen Deckgläsern klebt man zu beiden Seiten je eine Etikette. Auf der einen wird der Name des Objektes und die Bezeichnung des Organteiles, auf der anderen die Technik (Fixierung, Färbung, Einschlußmedium usw.) vermerkt. Handelt es sich um Serienschnitte, bei denen hauptsächlich große Deckgläser zur Verwendung kommen, bleibt meist nur Raum für eine Etikette. Es empfiehlt sich in diesem Fall, nur den Namen des Objektes sowie eine Ordnungsnummer zu vermerken. Auf einem dazu geführten Protokoll sind dann alle wissenswerten Einzelheiten über das Präparat einzutragen. Zu diesem Zweck habe ich Präparatlisten eingeführt, die sich als sehr praktisch erwiesen haben. Eine nähere Erklärung über ihre Einteilung gibt die nebenstehende Figur.

Fig. 28. Präparatenliste (Format: 21 × 8½ cm)

Oben an der Liste wird Name, Herkunft, Fixierung, Färbung usw. des Objektes verzeichnet. In die erste Kolonne (N) die Ordnungsnummer, in der zweiten (R) die Reihe der Schnitte, in die dritte (S) der Schnitt. Die vierte breite Kolonne ist dazu bestimmt, die wissenswerten Einzelheiten, die im betreffenden Schnitt zu beobachten sind, aufzunehmen. Auf diese Weise kann der ganze Inhalt eines Serienschnittpräparates aufgezeichnet und dadurch sofort wieder aufgefunden werden.

In manchen Fällen sind zur provisorischen Beschriftung der Präparate auch Glasschreibtinten oder Fettstifte zu empfehlen, zur dauernden dagegen Glasdiamanten.

Früher wurde öfters über ein Beschlagen der Deckgläser oder Objektträger bei alten Dauerpräparaten geklagt. Nach Weber[2]) sollte ein zu hoher Prozentgehalt der Gläser an Kalk das Beschlagen bewirken.

---

[1]) Über einen Kasten zum Aufbewahren von mikroskopischen Präparaten s. S. v. Wachenfeldt, Zeitschr. wissensch. Mikrosk. 1926, XLIII, S. 396.

[2]) R. Weber, Über den Einfluß des Glases der Objektträger und Deckgläser auf die Haltbarkeit mikroskopischer Präparate, Fortschr. d. Med., 1893, XI, S. 49; Ref. in Zeitschr. f. wiss. Mikr.

Zur schnellen Herstellung von Halbdauerpräparaten hat sich wiederholt (Aleuron, Agar-Agar-Diatomeen) eine konzentrierte Rohrzuckerlösung (event. mit Thymol versetzt) als brauchbar erwiesen (Tunmann[1]), für Diatomeen ist Chinolin, das sich nur sehr langsam verflüchtigt, geeignet (Amann).

Ist es nötig, ein Präparat umzubetten, sei es, weil Luftblasen unter das Deckglas drangen oder weil, was bei Kanadabalsam-Präparaten vorkommt, das Deckgläschen sich teilweise oder völlig loslöste, so kann man folgendermaßen verfahren:

Nachdem man den Lackrahmen oder Lackring soviel wie möglich mit einem spitzen Messer entfernt und das Abgeschabte mit einem trockenen Leinwandläppchen beseitigt hat, erwärmt man das Präparat, bis sich das Deckgläschen abheben läßt. Lag der Gegenstand in Kanadabalsam, so überträgt man ihn mit einer Nadel oder Pinzette in Terpentinöl; aus Glyzerin oder Glyzeringelatine bringt man ihn in lauwarmes Wasser. Nach Lösung des Einschlußmittels wird der Gegenstand wie ein frischer behandelt und eingeschlossen (Linde)[2].

Subvisible Gebilde

Nach einer Berechnung von Bechhold kann irgendein subvisibler Organismus keinen kleineren Durchmesser als 13—32 $\mu\mu$ haben, wenn er kugelförmig gedacht wird.

Gebilde bis zu ca. 75 $\mu\mu$ lassen sich noch der Form nach wiedergeben; nach einem Verfahren von Bechhold und Ville[3]) lassen sich noch Gebilde bis herunter zu etwa 4—10 $\mu\mu$ sichtbar machen, wenn man sie isolieren kann. Das Prinzip des Verfahrens ist das folgende: Die Flüssigkeit wird durch eine dichte Chamberland-Kerze filtriert, aus dem Filtrat wird das subvisible Gebilde durch ein Ultrafilter zurückgehalten und mit Goldchlorid vergoldet. Man streicht auf einem Objektträger aus, trocknet und verbrennt. Man benützt das Präparat, um eine Goldchloridlösung in Gegenwart von Kaliumferrizyanidlösung zu kolloidem Gold zu reduzieren. Das sich ausscheidende Gold setzt sich lediglich an die vorhandenen Goldteilchen an und das Gebilde wird als Pseudomorphose des ursprünglichen Gegenstands für das Auge sichtbar.

[1]) Auch Melasse läßt sich verwenden, nachdem sie mit 30 proz. Formalin bis zur gewünschten Konsistenz verdünnt und durch Glaswolle oder angefeuchtete Watte filtriert ist (Kündig, Ein billiges Einschlußmittel, Mikrokosmos 1927, XX, S. 56.)

[2]) O. Linde, Die Anfertigung pharmakognostischer Dauerpräparate.

[3]) H. Bechhold und L. Ville, Die Sichtbarmachung subvisibler Gebilde, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankheiten 1925/26, CV, S. 601.

Aschenpräparate (Spodogramme)

Auf die Beziehungen des Aschenbildes zur Pflanzenverwandtschaft und seine Anwendung in der Diagnose hat Molisch[1]) aufmerksam gemacht. Die Aschenpräparate gewähren besonders einen raschen Überblick über die Verteilung der Zystolithen bei den Acanthaceen und Urticaceen, über die stark verkieselten Kieselkurzzellen der Gramineen, die verkieselten Kegelzellen der Cyperaceen, die als Deckplättchen oder Stegmata bekannten Zellen mit bestimmt geformten Kieselkörpern, die bei Orchideen, Marantaceen, Musaceen und Palmen vorkommen u. dgl. m.

Über die diagnostische Bedeutung des Aschenbildes s. a. G. Klein, Pharmazeut. Presse, 1922, Folge 17.

Zur Herstellung von Aschenpräparaten für mikroskopische Untersuchungen werden die Pflanzenteile in einem offenen Porzellantiegel wenn möglich bis zum völligen Weißwerden verascht. Nach dem Abkühlen legt man Teile der Asche, ohne sie mehr als notwendig ist zu zerbröckeln, auf den Objektträger, behandelt mit einem Tropfen Anilin, Phenol (oder auch Kanadabalsam) und bedeckt mit einem Deckglas.

Zur Feststellung von Verkieselung behandelt man am Objektträger die Asche mit 20proz. Salzsäure oder mit Chromschwefelsäure, wobei die Kieselsäure ungelöst bleibt.

Über einen Apparat zur Gewinnung von Pflanzenaschen s. O. Werner, Mikrochemie 1929, VII, S. 110, ferner E. Tschopp, Biochem. Zeitschr. 1928, CCIII, S. 266 (geschlossenes System).

Die Behandlung des Aschenpräparates nimmt man nach Werner (l. c.) am besten folgendermaßen vor: Man bringt die Asche mit Hilfe einer Nadel, deren Spitze mit Phenol (oder einer anderen Flüssigkeit von geeignetem Lichtbrechungsvermögen) benetzt ist, in die Mitte eines Deckglases 30 × 40 mm, in der sich ein Tropfen derselben Flüssigkeit befindet. Man bedeckt mit einem Deckglas 20 × 20 mm und umrandet das kleinere Deckglas mit Paraffin. Das etwa unter dem Rande des kleineren Deckglases vortretende Phenol muß vor dem Umranden und wenn nötig während desselben mit einem Filtrierpapierstreifen abgesaugt werden.

---

[1]) H. Molisch, Aschenbild und Pflanzenverwandtschaft. Sitzungsber. Wien. Akad. Wiss. Math. nat. Kl. Abt. I, 1920, CXXIX, S. 261; K. Ohara, Über die Verwendung des Aschenbildes für die Bestimmung technisch verwendeter Hölzer, Denkschriften, Wien. Akad. wiss. Math. naturw. Kl. 1926, C, S. 301; J. Kisser, Biologia generalis 1928, IV, S. 131; O. Werner, Blattaschenbilder heimischer Wiesengräser als Mittel ihrer Verwandtschafts- und Wertbestimmung, ebenda S. 403.

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß die Asche von beiden Seiten mikroskopisch betrachtet werden kann. Wählt man als Einschlußmittel Kanadabalsam, so kann die Umrandung mit Paraffin wegbleiben.

Policard[1]) fixiert mit Formol oder Weingeist, trocknet die Schnitte sorgfältig und verascht sie mit Hilfe elektrischer Heizung. Die Präparate dienen zum Studium der Lokalisation der Mineralstoffe. Das Verfahren ist anscheinend für tierische Gewebe bestimmt.

Bringt man Pflanzenaschen in einen Tropfen Chlorzinkjod und bedeckt nach 2—4 Minuten mit einem Deckglas, so tritt in vielen Fällen blaue Färbung auf. Sie ist an das Vorhandensein alkalisch reagierender Bestandteile gebunden[2]).

Für die Erhaltung des Aschenbildes von Rinden benutzte Blabensteiner[3]) folgendes Verfahren: Man streicht 1—2 Tropfen einer 4- bis 5proz. Lösung von Zelloidin in einem Gemisch gleicher Teile Weingeist und Äther auf einen reinen Objektträger ungefähr zur Fläche eines halben Quadratzentimeter aus, wartet kurze Zeit, bis beim Wenden des Objektträgers kein Hängetropfen der noch flüssigen Zelloidinlösung mehr entsteht und nähert dann vorsichtig den gewendeten Objektträger dem auf dem erkalteten Platinblech liegenden veraschten Schnitt. Die Asche legt sich bei richtiger Ausführung an die Zelloidinfläche an. Hierauf bringt man den Objektträger in seine normale Lage und nähert der Zelloidinfläche vorsichtig die Öffnung einer etwa ein Viertel gefüllten Ätherflasche. Man läßt den Ätherdampf so lange einwirken, bis die untergesunkene Asche auch auf ihrer Oberseite von einem feinen Zelloidinhäutchen bedeckt ist, was sich durch ein glasiges Glänzen der sonst matten Oberfläche anzeigt. Man läßt dann die Zelloidinlösung mit der Asche am Objektträger eintrocknen, bis sie als feine Lamelle mit einer Rasierklinge leicht von diesem abgehoben werden kann. Dann wird das Plättchen entsprechend zugeschnitten und wie ein gewöhnlicher Schnitt in die Einschlußflüssigkeit gelegt.

[1]) A. Policard, La minéralisation des coupes histologiques per et son interêt comme méthode histochimique générale, Compt. rend. Acad. scien Paris 1923, CLXXVI, S. 1012. Derselbe, La microincinération des cellules et des tissus, Protoplasma 1929, VII, S. 464.

[2]) H. Molisch, Über die Bläuung von Pflanzenaschen durch Chlorzinkjod, Ber. Deutsch. bot. Ges. 1920, XXXVIII, S. 299.

[3]) W. Blabensteiner, Über die Verwendung des Aschenbildes für die Bestimmung pharmakognostisch benutzter Rinden, Sitzungsber. Wien. Akad. Wiss. Math. naturw. Kl. Abt. I, 1928, CXXXVII, S. 1. Hier auch ein Schlüssel zur Bestimmung der offizinellen Rinden auf Grund der Aschenbilder.

Czapla[1]) weicht die Rinden erst in Wasser ein, stellt dann die Schnitte her und zieht bei besonders „kinoreichen" Rinden diese noch 4—6 Stunden unter häufigem Wasserwechsel aus. Dann werden die Schnitte (150—250 μ stark) langsam getrocknet. Übermäßiges Erhitzen ist zu vermeiden.

Zur Einbettung läßt man eine genügende Menge Kanadabalsam-Xylollösung (1 : 6) auf den Objektträger tropfen und läßt vorsichtig die Asche darein gleiten. Das noch nicht bedeckte Präparat läßt man dann kurze Zeit eintrocknen, erst dann wird mit dem Deckglas bedeckt.

Weiter haben Ohara und Kondo das Aschenbild zur Erkennung von Drogen herangezogen (Journ. Pharm. soc. Japan, 1929, Nr. 573).

Verkohlungspräparate (Anthrakogramme)

Hollendonner[2]) hat zuerst gezeigt, daß man durch Verkohlen von Schnitten durch Holz und harte Zellulosegewebe Präparate erhält, die charakteristische Mikrophotographien liefern. Die Schnitte wurden unter dem Deckglas trocken oder nach Zusatz von Wasser oder Weingeist über der Flamme eines Bunsenbrenners unter ständiger Bewegung erhitzt. Nach Kisser[3]) schlägt man besser folgendes Verfahren ein, das auch für zarte Gegenstände geeignet ist. Nach Vorbehandlung mit Eau de Javelle bringt man die Schnitte in 96proz. Weingeist und daraus über ein Gemisch gleicher Teile von Weingeist und Benzol in reines Benzol und daraus in ein Schälchen mit Knochen- oder Paraffinöl. Nach vollständiger Durchdringung mit Öl werden sie an ein Ende eines Objektträgers gebracht und nach Bedeckung mit einem Deckglas 4 bis 5 cm über der Flamme eines Bunsenbrenners erhitzt, bis das Öl siedet. Man erhitzt so lange, bis die Membranen die gewünschte Färbung erreicht haben, was man nach dem Abkühlen unter dem Mikroskop kontrolliert. Während des Erhitzens muß stets Öl hinzugegeben werden, so daß die Schnitte stets in Öl erhitzt werden. Zu dem genügend verkohlten Schnitt gibt man nach dem Erkalten einige Tropfen Benzol oder Xylol und überträgt ihn in ein Schälchen mit denselben Flüssigkeiten. Sehr zarte Schnitte kann man damit auch auf dem Objektträger vom Öl befreien: Zuletzt werden die Schnitte in Kanadabalsam eingeschlossen.

---

[1]) K. Czapla, Aschenbilder technisch wertvoller Rinden. Sitzungsber. Wien. Akad. Wiss. math. naturw. Kl. Abt. I, 1928, CXXXVII, S. 17.

[2]) F. Hollendonner, Verkohlung und Photographieren von Pflanzengeweben, Mikrokosmos 1921/22, XV, S. 214.

[3]) J. Kisser, Das Anthrakogramm, Zeitschr. wiss. Mikroskopie 1929, XLVI, S. 286.

B. Spezielle Mikrochemie

I. Anorganischer Teil

Sauerstoff

Priestley wies schon die Abgabe von Sauerstoff durch assimilierende Pflanzen im Sonnenlichte nach. In der Physiologie benutzt man zu derartigen Experimenten vorzugsweise Wasserpflanzen, bei denen der Sauerstoff durch die gesamte Blattfläche ausgeschieden wird, während er bei Landpflanzen durch die Spaltöffnungen nach außen gelangt. Quantitativ ermittelt man den ausgeschiedenen Sauerstoff, indem man die Pflanzen oder Pflanzenteile in einen Rezipienten einschließt, in diesen einen Strom kohlensäurehaltiger Luft mit bestimmtem Sauerstoffgehalt einleitet und sodann in der abgesaugten Luft die Zunahme an Sauerstoff bestimmt. Pfeffer[1]) hat für abgeschnittene Blätter einen eigenen Apparat konstruiert. Hoppe-Seyler[2]) läßt den abgegebenen Sauerstoff auf Bluthämoglobin wirken und prüft letzteres spektralanalytisch. Helodeasprosse werden mit Wasser und etwas faulendem Blute in ein Glasrohr eingeschmolzen. Der im Glasrohr befindliche Sauerstoff wird nach einiger Zeit vollständig absorbiert, spektralanalytisch läßt sich in der Flüssigkeit kein Oxyhämoglobinstreifen mehr nachweisen. Bringt man nun das Glasrohr ins Sonnenlicht, dann assimiliert der Sproß, gibt von neuem Sauerstoff ab, die Flüssigkeit zeigt wiederum bei der spektroskopischen Prüfung den Oxyhämoglobinstreifen. Derart lassen sich noch 0,002 ccm Sauerstoff nachweisen, doch eignen sich nicht alle Wasserpflanzen zu diesem Versuch.

Eine empfindliche Reaktion auf Sauerstoff läßt sich darauf begründen, daß dieser eine alkalische Brenzkatechin-Ferrosulfatlösung rötet[3]).

Zum mikroskopischen Nachweis bedient man sich der Bakterienmethode von Engelmann[4]). Die erforderlichen Bakterien sind leicht zu beschaffen. Man erhält sie, wenn man Erbsen oder andere Hülsen-

---

[1]) W. Pfeffer, Pflanzenphysiologie, II. Aufl., 1897, I, S. 292.

[2]) F. Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1877, I, S. 121.

[3]) K. Binder und R. F. Weinland, Ber. Deutsch. chem. Ges. 1913, XLVI, S. 255.

[4]) Th. W. Engelmann, Neue Methode zur Untersuchung der Sauerstoffausscheidung pflanzlicher und tierischer Organismen, Botan. Zeitg., 1881, XXXIX, S. 441.

früchte einige Tage in Wasser faulen läßt. Von diesem faulenden Wasser überträgt man einen Tropfen in Cohnsche Normallösung (1 g saures phosphorsaures Kali, 1 g schwefelsaure Magnesia, 2 g neutrales weinsaures Ammoniak, 0,1 g Chlorkalzium, 200 g destilliertes Wasser). Nach wenigen Tagen erhält die milchig trübe gewordene Nährlösung eine grünliche Kahmhaut, die im Zoogloea-Stadium unbewegliche Bakterien enthält, während in der Nährlösung sich zahlreiche 1,5 μ lange stäbchenförmige Bakterien finden, die in ruckweiser Bewegung begriffen sind. Diese Bakterien stellen ihre Bewegungen bei Sauerstoffmangel ein, um sie bei Zutritt von Sauerstoff sofort wieder aufzunehmen, und zwar in der Richtung der Sauerstoffquelle hin. Bringt man einen Tropfen der die Bakterien enthaltenden Nährlösung unter Deckglas, so erhalten die Bakterien ihre Bewegungen am längsten am Deckglasrande, wo die letzten Sauerstoffmengen noch vorhanden sind, und sammeln sich dort auch an. Man bringt das zu prüfende möglichst zarte Präparat (zur Demonstration verwendet man Algenfäden, Spirogyra) in einen Tropfen Wasser, fügt eine größere Anzahl der gezüchteten Bakterien (B. Termo) zu und verkittet den Deckglasrand mit Wachs, Paraffin, Vaselin oder Kakaobutter, um sowohl Strömungen im Untersuchungstropfen zu verhindern, als auch die Flüssigkeit vor dem Verdunsten zu schützen und auch den Zutritt neuen Sauerstoffes zu verhindern. Die Bakterien sammeln sich an der Sauerstoffquelle, bei Spirogyra beispielsweise an jenen Stellen, an denen das Chlorophyllband der Membran anliegt. Bei Verdunklung des Präparates, bei Einstellung der Assimilation, hört die Bakterienbewegung auf, um bei erneuerter Belichtung momentan wieder einzutreten.

Mittels eines Mikrospektralobjektivs läßt sich auch die Stärke der Kohlensäureassimilation in allen Teilen des Spektrums messen. Näheres hierüber bei Engelmann, Bot. Zeitg., 1882, XL, S. 419.

Vielfach wird die Photo-Methode von Beijerinck[1]) angewandt. Sie gelingt nicht nur mit Pflanzenteilen (Fucus, Helodea), sondern auch wenn man lebende Blätter vom Klee mit destilliertem Wasser zerreibt und das Filtrat, welches zahlreiche Chlorophyllkörner enthält, mit Leuchtbakterien in einer Flasche mischt. Nach kurzer Zeit (etwa ½ Stunde) wird die Mischung dunkel. Von neuem dem Licht ausgesetzt, wird die Flüssigkeit wieder leuchtend, d. h. die Bakterien leuchten wieder, infolge des im Lichte entbundenen Sauerstoffes. Molisch[2])

---

[1]) M. W. Beijerinck, Kulturvers. m. Zoochlorellen, Bot. Ztg. 1890, S. 744. Photobacter, as a React. in the Investig. of the Chlorophyllfunction, K. A. Amsterdam 1901, S. 45, Zentralbl. f. Bakt., 1902, IX, S. 685.

[2]) H. Molisch, Über Kohlensäureassimilationsversuche mittels der Leuchtbakterienmethode, Botan. Ztg., 1904, LXII, S. 1.

verwendet als Leuchtbakterie Micrococcus phosphoreus Cohn, der von Rindfleisch leicht zu erhalten ist, und benutzt zur Kultur eine schwach alkalische Fleischbouillon von folgender Zusammensetzung: 1 Liter verdünnter Rindfleischsaft (von $^1/_8$ kg Rindfleisch), 10 g Pepton, 10 g Glyzerin und 30 g Kochsalz. Präparatengläser (etwa von 9 cm Höhe und von 2 cm lichter Weite mit Glasstöpseln) werden zu $^1/_3$ mit dem Filtrat des Pflanzenbreies beschickt, dann mit leuchtender Bouillon völlig angefüllt und der Stöpsel unter Vermeidung von Luftblasen aufgesetzt. Am besten gelingen die Versuche bei 5—20° C, da bei dieser Temperatur Micrococcus phosphoreus seine größte Leuchtkraft besitzt. Versuchsobjekte sind Blätter von Trifolium pratense, Lamium album, Sambucus nigra, Calendula officinalis, welche auch grüne Preßauszüge geben. Bräunlich gefärbte Filtrate (von Robinia pseudacacia, Rheum, Abies excelsa) bringen die Photobakterien nicht zum Aufleuchten. Selbst der Preßsaft von toten Blättern von Lamium album entbindet Sauerstoff und bewirkt ein Aufleuchten. Doch dürfen die Blätter nur an der Luft und im Exsikkator getrocknet sein und nicht bei 100° C. Hingegen vertragen sie ein Trocknen bei 50—70°, wie V. Baldasseroni[1]) fand (bei Spinacia oleracea, Senecio vulgaris, Veronica u. a.), der als Leuchtbakterie Micrococcus phosphoreus und Photobacterium italicum benutzte.

Weniger empfindlich als die vorhergehenden Reaktionen ist der Nachweis des Sauerstoffs durch Oxydation von Indigweiß zu Indigo. Näheres s. J. Regnard, Compt. rend. Acad. sciences Paris 1885, CI, S. 1293; L. Kny, Ber. Deutsch. bot. Ges. 1897, XV, S. 388.

Wasserstoffperoxyd

Wasserstoffperoxyd hemmt das Wachstum und ist für Pflanzen stark giftig, eine Ansicht, die allerdings von Bach und Chodat[2]) verneint wurde. Nach Pfeffer (Physiologie) schadet „eine vorübergehende Einwirkung einer konz. Lösung weniger als eine andauernde Einwirkung einer verdünnten Lösung". Einer der ersten, der sich mit dem Nachweis von Wasserstoffperoxyd in den lebenden Geweben beschäftigte, war Clermont[3]). Seine positiv ausgefallenen Versuche wurden jedoch von Bellucci[4]) *nicht bestätigt* und auch die in den folgenden Jahren von Loew[5]), Bokorny und Pfeffer angestellten Untersuchungen konnten den Beweis für die Gegenwart von Wasserstoffperoxyd in den lebenden Zellen nicht erbringen. Auch Lopriore (Ber. Deutsch. bot. Ges. 1928, XLVI, S. 420)

[1]) V. Baldasseroni, Ricerche sull'assimilazione del carbonio fuori dell' organismo virente, Annali di Bot., 1906, IV, S. 287.

[2]) R. Chodat und Bach, Ber. chem. Ges., 1902, XXXV, S. 2487.

[3]) Clermont, Compt. rend., 1875, LXXX, S. 1591.

[4]) Bellucci, Ber. chem. Ges., 1876, IX, S. 83.

[5]) O. Loew, Ber. chem. Ges., 1889, XXII, S. 146.

ist der Ansicht, das im Protoplasma normalerweise weder Wasserstoffperoxyd, noch aktivierter Sauerstoff vorkommt.

Bokorny[1]) benutzte zum Nachweis lebende Spirogyren. Stärkehaltige Spirogyren wurden in eine sehr verdünnte Lösung von Eisenvitriol und Jodkalium gebracht. Bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd hätten die Zellen Blaufärbung zeigen müssen, da sowohl Wasserstoffperoxyd als Ferrisalz aus Jodkalium Jod frei machen und letzteres die Stärke bläut. Zellfäden, die mit Wasserstoffperoxyd getränkt waren, zeigten die Färbung, die lebenden Spirogyren aber nicht. Ein negatives Resultat lieferte auch ein Verfahren, welches den eisenbläuenden Gerbstoff der Spirogyren zur Reaktion heranzog, der durch das System Wasserstoffperoxyd — Eisenvitriol sofort blau gefärbt wird. Wasserstoffperoxyd fehlte, die Blaufärbung trat erst ganz allmählich ein und war eine Folge der langsamen Oxydation des Eisenvitriols durch die Luft. — Bokorny lieferte auch experimentell den Nachweis, daß die benutzten, stark verdünnten Reagentien von den lebenden Zellen aufgenommen werden. Pfeffer[2]), der anfangs gegen vorstehende Befunde Einwände erhob, kam bei erneuerten Versuchen zu gleichen Ergebnissen und konnte insbesondere bestätigen, daß lebende Zellen sehr gut ohne Störung stark verdünnte Reagenzlösungen (Eisenvitriol, Cyanin) aufzunehmen vermögen. Er zeigte, daß künstlich in den Zellsaft eingeführte Wasserstoffperoxydlösungen (0,01—0,1%, die in der käuflichen Lösung enthaltenen Spuren freier Salzsäure werden zuvor mit Natriumbikarbonat neutralisiert) abnorme Oxydationsprozesse hervorrufen. Beispielsweise wird der farblose Zellsaft in den Epidermiszellen der Keimpflanzen von Vicia faba (Stengel, Wurzel) oder der in den Wurzelhaaren von Trianea bogotensis braungefärbt, nach längerer Einwirkung erfolgt Ausscheidung braunschwarzer, körniger Massen.

Außerdem zeigte sich, daß blauer Zellsaft durch Wasserstoffperoxyd entfernt wird oder gelbe bis braune Farbe annimmt. Hierauf fußend, wurde nun eine durch Erwärmen bereitete wässerige Cyaninlösung in Wurzelhaare (Trianea bogotensis) eingeführt, die Zellen nehmen lebend den Farbstoff auf. Nachfolgender Zusatz von Wasserstoffperoxyd bewirkte wiederum innerhalb einer Minute Entfärbung des künstlich gefärbten Zellinhalts.

[1]) Th. Bokorny, Das Wasserstoffsuperoxyd und die Silberabscheidung durch aktives Albumin, Jahrb. f. wiss. Bot., 1886, XVII, S. 347. Über d. Nachweis von Wasserstoffsuperoxyd in lebenden Pflanzenzellen, Ber. d. botan. Ges., 1889, VIII, S. 275.

[2]) W. Pfeffer, Beiträge zur Kenntnis der Oxydationsvorgänge in lebenden Zellen, Abh. Sächs. Ges. d. Wissensch., math. natur. Kl. 1889, XV, S. 375.

Bei Belichtung von Chlorella in phosphatfreier Knopscher Lösung, die in Beziehung auf Blausäure $n/_{100}$ ist, tritt in die Flüssigkeit Wasserstoffperoxyd bis zur Konzentration $n/_{1000}$ über. Es entsteht durch Photooxydation des Chlorophylls. Der Nachweis erfolgt mit Titansäure (Gelbfärbung)[1].

Man erhält das Reagens, indem man 1 Teil käufliches Titandioxyd mit 15—20 Teilen Kaliumpyrosulfat schmelzt und die Schmelze nach dem Erkalten in kalter verdünnter Schwefelsäure löst (Treadwell).

Schwefel

Schwefel findet sich in den Pflanzen vorzugsweise in organischer und anorganischer Bindung, tritt aber auch in elementarer Form auf.

In elementarer Form kommt Schwefel mit Sicherheit nur in niederen Pflanzen vor. Studienobjekte sind Schwefelbakterien (auch S-haltige Purpurbakterien (Thiorhodaceen) und -algen. Cramer[2]) hatte Schwefelkörnchen in Beggiatoaarten entdeckt, später berichtete Cohn[3]) über schwefelhaltige Organismen. Unser heutiges Wissen verdanken wir vor allem Winogradsky[4]). Eine umfassende Darstellung gab Omelianski[5]). In Oscillarien fand Hinze[6]) schwefelhaltige Gasvakuolen und Lauterborn[7]) im Bodensee mit Gallertscheiden versehene Bakterien mit Schwefelkörnchen erfüllt, die er Thioploca nennt. Jönsson[8]) gibt für das Mycel von Penicillium, das auf verdünnter Schwefelsäure gezogen war, Schwefelkörper an, die denen der Beggiatoa nahestehen und aus Schwefel und einer ölartigen Substanz bestehen sollen. Schwefelbakterien sind stets in schwefelhaltigen Gewässern anzutreffen, oxydieren Schwefelwasserstoff, ohne den sie nicht zu leben vermögen, zu Schwefel, verbrennen letzeren interzellulär weiter zu Schwefelsäure und erreichen dadurch den gleichen Nutzeffekt, den andere Organismen mit der Atmung erzielen. Miyoshi[9]) berichtet über die Schwefelbakterien japanischer

[1]) K. Tanaka, Versuche zur Prüfung der Wielandschen Atmungstheorie, Biochem. Zeitschr. 1925, CLVII, S. 425.

[2]) C. Cramer, Chem. phys. Beschr. d. Thermen von Baden in d. Schweiz, 1870.

[3]) Ferd. Cohn, Beitr. z. Biologie d. Pfl., 1875, I, S. 141.

[4]) S. Winogradsky, Beitr. z. Morph. u. Physiologie d. Bakterien, 1888, Heft 1, Schwefelbakterien.

[5]) Omelianski, Der Kreislauf d. Schwefels in Lafars Handbuch d. techn. Mykologie, 1904, III.

[6]) G. Hinze, Schwefeltropfen in Oscillarien u. Gallen von Begiatoa m., Ber. d. bot. Ges., 1900, XVIII, S. 394 u. 1901, XIX, S. 369.

[7]) Lauterborn, Ber. d. bot. Ges., 1907, XXV, S. 238.

[8]) Jönsson, Entstehung schwefelhaltiger Ölkörper in den Mycelfäden von Penicillium glaucum, Bot. Centralbl., 1889, XXXVII, S. 201.

[9]) M. Miyoshi, Studien über die Schwefelrasenbildung und die Schwefelbakterien der Thermen von Yumoto bei Nikko, Journ. of the Coll. of Sc. Tokyo 1897, X.

Thermen. Zu den farblosen Bakterien zählen dort: Thiotrix und Beggiatoa, von roten Schwefelbakterien kamen Chromatium-Arten und Thioderma roseum vor. Bütschli[1]) fixierte Schwefelbakterien mit Jodalkohol und färbte mit Delafields Hämatoxylin. Aspergillus niger bildet bei Kultur auf Lösungen von thioschwefelsaurem Natrium Schwefeltröpfchen in den Hyphen, in abgestorbenen Zellen kristallisiert der Schwefel in Form von Doppelpyramiden aus[2]).

Nach Keil[3]) können die Schwefelbakterien in einer Flüssigkeit gedeihen, die frei von jeder Spur organischer Stoffe ist. Als Kohlenstoffquelle kommt allein Kohlensäure in Betracht.

Beggiatoa und Thiotrix verwenden Ammoniumsalze als Stickstoffquelle.

Die Schwefelbakterien vermögen organische Stoffe in nicht zu hohen Konzentrationen zu ertragen, ihre Lebensvorgänge werden aber dadurch nicht gefördert.

Über Kultur von Purpurbakterien und Gewinnung ihrer Farbstoffe s. E. Schneider, Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1930, XVIII, S. 81.

Die wasserbewohnenden Schwefelbakterien sind leicht zu züchten. Man zerschneidet ein frisch aus dem Sumpfe ausgehobenes Rhizom einer Butomusart sofort, ohne es abzuwaschen, und übergießt es in einem geeigneten Gefäße mit 3—5 Liter Wasser, dem einige Gramm Gips zugesetzt sind. Nach einigen Tagen tritt Schwefelwasserstoffgeruch auf, der Bodensatz färbt sich schwarz, die Flüssigkeit wird opaleszent und in einigen Wochen sind Schwefelbakterien auffindbar, vorzugsweise farblose, bewegliche, relativ starke (bis 35 μ) Beggiatoafäden, dann farblose festsitzende Thiotrixfäden, daneben treten auch rote Formen auf. Das Gefäß muß im Dunkeln gehalten werden, im Lichte entwickeln sich grüne Oscillarien und grüne Zooglöen, der Schwefelwasserstoffgeruch hört allmählich auf. Man kann ferner Schwefelbakterien durch Mazeration von Heu in gipshaltigem Wasser gewinnen. Zerkleinertes Heu wird 10 Tage in Wasser mazeriert und dann wiederholt in reinem Wasser gekocht. Eine Handvoll von diesem Heu wird in ein tiefes Gefäß mit

[1]) O. Bütschli, Bemerkungen über Cyanophyceen und Bacteriaceen, Arch. f. Protistenk., 1902, I, S. 41, Ref. Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1902, XIX, S. 119.

[2]) M. Raciborski, Einige Chemomorphosen des Aspergillus glaucus, Bull. de l'Ac. de Cracovie, 1906, S. 764.

[3]) F. Keil, Beiträge zur Physiologie der farblosen Schwefelbakterien. Cohns Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1912, XI, S. 335. Vgl. a. J. Buder, Zur Biologie des Bakteriopurpurins und der Purpurbakterien, Jahrb. f. wiss. Bot. 1919, LVIII, S. 525.

[4]) Über die Züchtung von Schwefelbakterien vgl. a. J. Buder, Jahrbücher f. wissensch. Bot. 1915, LVI, S. 539.

gipshaltigem Wasser gebracht und eine Messerspitze Sumpfschlamm zugesetzt. Bereits nach wenigen Tagen beginnt die Entwicklung von Schwefelwasserstoffgeruch. Die Beggiatoafäden, die zunächst ungegliedert erscheinen, sind mehr oder weniger angefüllt mit verschieden großen, stark lichtbrechenden, zähflüssigen oder ölartigen Schwefelkugeln. Die Querwände der einzelnen Zellen treten erst nach längerem Verweilen der Fäden in Brunnenwasser deutlich hervor, wobei allerdings die Schwefelkugeln rasch abnehmen (die Querwände sind übrigens an entschwefelten Fäden gut zu sehen, besonders nach Zusatz von Jodreagentien).

Die Schwefelkugeln lösen sich unter Deckglas nicht in Wasser und Salzsäure, hingegen ziemlich schnell in heißer Kalilauge, in Salpetersäure + chlorsaurem Kali, in einer wässerigen Lösung von schwefligsaurem Natron und beim Durchsaugen von absolutem Alkohol. In Schwefelkohlenstoff sind sie ebenfalls bis auf Spuren löslich, doch durchdringt derselbe die lebende Zellmembran schlecht. Man tötet die Fäden, indem man sie auf dem Objektträger eintrocknen läßt und fügt dann erst Schwefelkohlenstoff zu. Bütschli[1]) fand ferner die Kugeln in 10proz. wässeriger Sodalösung und innerhalb eines Tages in künstlichem Magensaft löslich (?).

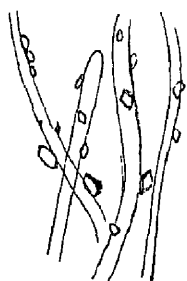



Fig. 29. Kristallini-

Da der Schwefel in den lebenden Zellen in seiner amorphen oder plastischen Modifikation auftritt, so benutzt man seine Überführung in die kristallinische Modifikation zur Diagnose. Winogradsky brachte die Fäden auf Minute in eine konzentrierte wässerige Pikrinsäurelösung, wusch mit viel Wasser aus, worauf sich der Schwefel innerhalb eines Tages sowohl in seiner rhombischen als in seiner monoklinen Modifikation ausschied (Fig. 29). Hinze, der die Körnchen in den Zellen von Thiophysa volutans als Schwefel identifizierte (l. c.) und überdies in den entschwefelten Thiophysen Schwefelbildner auffand, bringt die Schwefelkugeln dadurch zur Kristallisation, daß er die Präparate in reines Glyzerin einträgt; der Schwefel kristallisiert langsam in monoklinen Kristallen aus. In konzentrierter Salpetersäure erfolgt Kristallbildung schon nach einigen Stunden. Auf gleiche Weise gelang es ihm, den Nachweis zu führen, daß die „Gasvakuolen“ der Oscillarien Schwefel enthalten. Diese lösen sich in absolutem Alkohol, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, wobei ein Rest ungelöst bleibt. Sie sind unlöslich in konzentrierter Pikrinsäure, verdünnter Essigsäure, verdünnter Salzsäure,

[1]) O. Bütschli, Über den Bau der Bakterien und verwandter
Leipzig 1890.

1proz. Chromsäure, Glyzerin, Salpetersäure, verdünnter und konzentrierter Kalilauge und in konzentrierter Schwefelsäure. Sie verhalten sich demnach ebenso wie die Schwefeltropfen der Beggiatoen. Die sogenannten Gasvakuolen wurden bereits von P. Richter[1]) für schwefelhaltig angesprochen. Später hielt sie Klebahn[2]) für Gasbläschen (Luft oder Stickstoff führend), eine Ansicht, die von Molisch durch Isolierung der Bläschen widerlegt wurde, welcher sehr kleine Körnchen in ihnen vorfand. Die Isolierung gelingt leicht, wenn man frisches Material (Aphanizomenon flos aquae) auf dem Objektträger in 10proz. Kalisalpeterlösung bringt. Die Fäden zerfallen bereits nach 24 Stunden, es resultiert eine blaue Lösung (von Phycocyan), in der viele Gasvakuolen isoliert sind, besonders wenn man durch Druck (mit einem Kork) auf das Deckglas die Zellen zum Platzen bringt. Es sind demnach zähflüssige, fast weiche Körper. Molisch[3]) dachte daran, daß die „Gasvakuolen" aus einer Grundsubstanz und einem Imprägnierungskörper beständen. Läßt man nämlich auf Gloiotrichia unter Deckglas 20proz. Kalilauge einwirken, dann verschwinden die „Vakuolen"; bei nachfolgendem Zusatz von Methylenblau in 1 proz. wässerigem Ammoniak treten aber die von ihnen vordem eingenommenen Stellen blau gefärbt hervor, so daß es den Eindruck macht, „als ob die Kalilauge eine Gerüstsubstanz der „Gasvakuole" zurückgelassen hätte, die sich mit Methylenblau färbt und erst hierdurch in Erscheinung tritt." — Auf ganz andere Weise werden die Gebilde von A. Fischer gedeutet. Sie sollen das erste sichtbare Assimilationsprodukt der Oscillarien sein, Kohlenhydratnatur besitzen und wurden von ihm Anabaenin (s. d.) genannt.

A. Fischer weist den Schwefel in Präparaten von Chromatium, die bei Betrachtung in Luft Schwefel und Farbstoff getrennt enthalten, dadurch nach, daß er die Chromatien direkt in Kanadabalsam oder in Dammarlack legt. Schon nach 10 Minuten entfärben sich die Chromatien, und es bilden sich „rot gefärbte Schwefelkörnchen".

Der zu den unentbehrlichen Elementen zählende Schwefel steht den Pflanzen überall im Boden in Form von Salzen zur Verfügung. In den Zellen tritt er in **anorganischer** und **organischer Bindung** auf. Sind doch, wie schon Scheele wußte, die Eiweißstoffe schwefelhaltig. Die Proteine der Pflanzen haben meist 2%

[1]) P. Richter, Gloiotrichia echinulata, eine Wasserblüte des großen und kleinen Plöner Sees, Forschungsber. Plöner Station, 1894, II, S. 42.

[2]) H. Klebahn, Gasvakuolen, ein Bestandteil der Zellen der Wasserblütebildenden Phycochromaceen, Flora, 1895, LXXX, S. 241 und Forschungsber. Station Plön, 1896, IV und 1897, V.

[3]) H. Molisch, Die sogenannten Gasvakuolen und das Schweben gewisser Phycochromaceen, Bot. Ztg., 1903, LXI, S. 47, und: Zwei neue Purpurbakterien mit Schwebekörperchen, Bot. Ztg., 1906, LXIV, S. 223.

Schwefel, die tierischen Keratine sind schwefelreicher (4—5%). Tammann[1]) verfolgte den Schwefelgehalt bei der Keimung der Erbse. Nach Schulze[2]) entstehen in Keimpflanzen bei der Oxydation der primären Zersetzungsprodukte der Eiweißstoffe Sulfate, die dann proteiden Ursprungs sind. Eiweißschwefel ist nicht nur im Samen, sondern auch im Blatte vorhanden. In einigen Fällen ist in den Blättern während der Vegetationsperiode eine Abnahme an Schwefel festgestellt worden, in anderen nicht; ob diese Abnahme eine absolute ist und in Beziehung zu den Eiweißstoffen steht, bleibt noch zu ermitteln. Durch hohen Schwefelgehalt zeichnet sich die Asche der Cruciferen aus, die (schwefelhaltige) *Senfölverbindungen führen* (*Cochlearia armoracia* 17,12%, *Brassica oleracea* 20% SO_3 in der Asche). In Holz und Rinde liegen wohl überwiegend Sulfate vor. Reich an Schwefel ist der Splint (im Mittel 2—4%, bei Morus alba 9,82%, Pinus strobus 10,29%). Die Rinden führen meist weniger als 1%, doch werden für Chinarinden 4—6%, für die Borke der Fichte 6% angegeben. Im Sekretwasser der Drüsen der Halophyten finden sich Sulfate von Kalium, Natrium und Magnesium (Schtscherback)[3]). Da die Bestimmung des Schwefels in der Asche ausgeführt wird, so wissen wir in den meisten Fällen nichts Bestimmtes über die Art der Bindung. Auch die Asche der Meeresalgen ist reich an Schwefel.

In der Nähe der Röstöfen (für Spateisenstein), die die Luft mit Schwefligsäureanhydrid erfüllen, erkranken zuweilen Pflanzen (Fichten). In der Pflanze wird die schweflige Säure zu Schwefelsäure oxydiert. In solchen Fällen kann abnorm hoher Gehalt an Schwefelsäure in den Pflanzen bei Berücksichtigung der Sulfate des Bodens als Beweis für die schädigende Wirkung der Gase dienen[4]).

Der Schwefelgehalt ist überwiegend in der Asche ermittelt worden. Die mikrochemischen Methoden stützen sich im wesentlichen auf die Angaben Schimpers[5]). Viele Verbindungen der Schwefelsäure sind wasserlöslich, die zu prüfenden Schnitte dürfen somit vorher nicht gewässert worden sein. Hingegen kommt es in Weingeist- und Glyzerin-Präparaten und -Material bisweilen zur Ausscheidung von Sulfaten. Dabei ist zu beachten, daß Sulfate (allerdings auch Nitrate) meist schwer- oder unlöslich in 70—80proz. wässeriger Chlorhydratlösung sind (Schaer)[6]). Trägt man Schnitte direkt in Baryumchlorid (1 : 10)

[1]) Tammann, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1885, IX, S. 416.

[2]) E. Schulze, Ber. deutsch. bot. Ges., 1903, XXI, S. 67.

[3]) J. Schtscherback, Ber. deutsch. bot. Ges., 1910, XXVIII, S. 30.

[4]) R. Hartig, Über die Einwirkung des Hütten- und Steinkohlenrauches auf die Gesundheit der Nadelhölzer, Forstl.-naturw. Ztschr., 1896; A. Wieler, Untersuchungen über die Einwirkung von schwefliger Säure, Berlin 1907; K. Feist, Nachweis einer Schädigung von Fichten durch Röstgase, Arch. d. Pharm., 1911, CCXLIX, S. 7.

[5]) A. F. W. Schimper, Zur Frage d. Assimil. d. Mineralsalze d. d. grüne Pflanze, Flora, 1890, LXXIII, S. 219.

[6]) E. Schaer, Neuere Beobacht. üb. Verwend. d. konz. Chloralhydratlös., Schw. Wochenschr. f. Chem. u. Pharm., 1910, XLVIII, S. 618.

ein, dann zeigt Bildung von rhombischen Täfelchen Baryumsulfat an. Doch fällt der Niederschlag oft nur amorph aus. Strontiumnitrat (1 : 10) bedingt die Bildung kleiner rundlich rhombischer Kriställchen von Strontiumsulfat, die in Wasser natürlich unlöslich sind.

Kalziumazetat, welches in der Chemie als Fällungsmittel benutzt wird, versagt beim Nachweis im Gewebe oft, wahrscheinlich, weil Pflanzensäuren zugegen sind.

Gola[1]) deutete die mit alkalischer Nitroprussidnatriumlösung in meristematischen Geweben (Sproß- und Wurzelspitzen, Asparagus) eintretende Rotfärbung auf Schwefel, Moerner[2]) hatte diese Reaktion, die übrigens Haushofer[3]) ebenfalls als Schwefel-

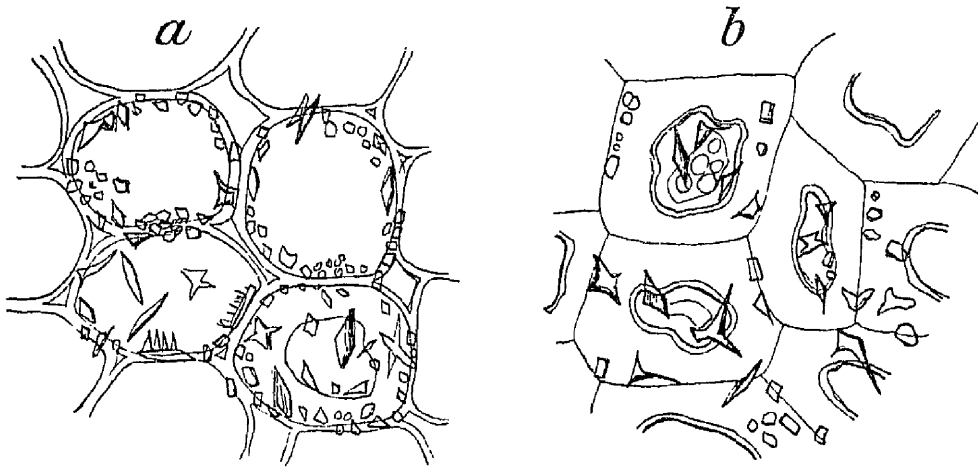



Fig. 30. Schwefelnachweis mit [illegible] a) Cochlearia armoracia (Wurzel); b) Strychnosnux vomica (Endosperm, [illegible] entfettet, dann verd. Salzsäure, Baryumchlorid, Wasser, Chloralhydrat) (Tunmann)

reaktion empfiehlt, vorher für Cystein angegeben. Auch mit Glutathion (s. d.) tritt sie ein. Bei der Nachprüfung erwies sie sich bei Asparagus umständlich und launisch.

Emich[4]) empfiehlt sulfidhaltige Objekte nach dem Benetzen mit Kalziumchlorid Bromdämpfen auszusetzen. Die gefällten Sulfide und auch freier Schwefel werden schnell oxydiert und es bilden sich Gipsnadeln. Bei der Meerrettigwurzel und bei einigen Rinden erhielt Tunmann keine Erfolge. Durch die Bromdämpfe treten gleic zeitig die Al aloide in Reaktion, Stärke wird gefärbt u. a.

Bei der Nachprüfung hat sich zum Nachweis von Sulfaten im Gewebe Baryumchlorid in jeder Hinsicht als das beste Reagens bewährt (Fig. 30). Nur erhält man den Niederschlag nicht, wie Schimper

[1]) G. Gola, Lo zolfo e i suoi composti nell' economia delle piante, Malpighia, 1902, XVI, S. 368.

[2]) Moerner, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1900, XXVIII, S. 594.

[3]) K. Haushofer, Mikr. Reakt., S. 116.

[4]) Fr. Emich, Zeitschr. f. anal. Chemie, 1893, XXXII, S. 163.

angibt, in Täfelchen, sondern teils körnig, teils in langgestreckten x-förmigen Skeletten, die bei gewöhnlicher Beleuchtung wie lang ausgezogene Oktaeder aussehen. Zuweilen finden sich dreieckige Täfelchen, zierliche Sternchen und isoliert liegende federartige Formen. Die Kristalle zeigen bei auffallendem Lichte hellen Fettglanz. Die gleichen Fällungen erhält man mit reinen Substanzen. Die Schnitte müssen nach der Behandlung mit Baryumchlorid gut ausgewaschen werden[1]), sie können dann in Chloralhydrat aufgehellt werden. Zum Nachweis in Samen werden die Schnitte mit Äther vom Fett befreit, nach dem Austrocknen auf dem Objektträger einige Zeit in wenig verdünnter Salzsäure (1 : 10) liegen gelassen und schließlich mit Baryumchlorid versetzt. Sind größere Sulfatmengen zugegen, wie bei Cochlearia armoracia, dann sind die Zellen mit Baryumsulfat oft ganz erfüllt, meist entstehen die Fällungen an den Zellwänden. Schimper hatte (a. a. O. S. 222) bei Samen und Knollen (Solanum) mit Baryumchlorid keine Reaktion erhalten. Betupfen der Schnitte mit einer Spur verdünnter Salzsäure vor dem Baryumzusatz bringt hier öfters Erfolg.

Die löslichen **Kalium-** und **Natriumsalze** der Schwefelsäure weist man mit Nickelsulfat (1 : 10) nach. Hierbei entstehen in gut ausgebildeten monoklinen Prismen auskristallisierende Doppelsalze, die sich allerdings recht leicht in Wasser lösen, so daß die Reaktion für Lokalisationsermittelungen nicht geeignet ist. Auf alle Fälle empfiehlt sich mehrtägiges Austrocknen der Objekte im Exsikkator.

Verdunstet man den sulfathaltigen wässerigen Auszug einer Asche, dann scheidet sich zuerst das schwerlösliche Kaliumsulfat in hexagonalen Täfelchen aus. Diese Täfelchen werden durch Baryumchlorid in farblose, durch Platinchlorid in rötliche Körnchen übergeführt. Kaliumsulfat könnte auch mit einer wässerigen Lösung von Bismarckbraun identifiziert werden, es müßten sich alsdann nach Retgers[2]) faserige, stark dichroitische Kristalle abscheiden.

Der von Behrens empfohlene Nachweis der Sulfate mit Benzidinhydrochlorid ist unsicher, da mehrere Pflanzensäuren schwerlösliche Benzidinverbindungen geben.

Lösliche Sulfate kommen nach Kisser[3]) selten in größeren Mengen vor, so im Stengel von Eupatorium adenophorum[4]). Er verwendet

[1]) Die Ausfällung von Baryumnitrat ist an sich möglich, die dazu nötige Konzentration von Nitrat dürfte wohl nie vorhanden sein.

[2]) J. W. Retgers, Künstl. Färbung von Kristallen mittels organisch. Farbstoffen, Zeitschr. physik. Chem. 1893, XII, S. 600.

[3]) J. Kisser, Beitrag zum histochemischen Nachweis des Kalziums. Pharmazeut. Presse 1923, Folge 4.

[4]) Behandelt man Schnitte durch den Stengel von Eupatorium adenophorum

zum Nachweis die Bildung von Gips durch eine Lösung von 1 g Kalziumnitrat in 10 ccm 96proz. Weingeist, der man 10—15 Tropfen konzentrierter Salpetersäure zusetzt[1]). Durch das Reagens werden auch Oxalate gefällt.

Zur Prüfung auf organisch gebundenen Schwefel brüht Klein[2]) die Schnitte in kochendem Wasser und wässert sie gründlich. Nachdem man sich an einigen Schnitten mit Bariumchlorid von der völligen Entfernung der Sulfate überzeugt hat, bringt man die Schnitte auf 3—5 Stunden in Bromdampf (über die Öffnung einer Bromflasche), und setzt dann Kalziumchlorid hinzu. Durch das Brom wurde der organisch gebundene Schwefel in Schwefelsäure übergeführt und ergibt dann Kalziumsulfat.

Interessant ist das Vorkommen von äußerst kleinen Prismen und Täfelchen in Desmidiaceen, die nach A. Fischer aus **Kalziumsulfat** bestehen und teils in scharf begrenzten Vakuolen auftreten (in den Zellenden von Closterium, von Steinecke als Statolithen aufgefaßt), teils im Zellsaft zerstreut sind. Diese Gipskristalle lösen sich langsam in kalter Kalilauge, Salz- und Salpetersäure, sofort beim Erhitzen in diesen Reagentien. Sie sind unlöslich in Essigsäure und in kalter konzentrierter Schwefelsäure, bleiben auch beim Glühen unverändert zurück. Baryumchlorid führt sie in Baryumsulfat über, das in Salpetersäure und in Salzsäure unlöslich ist[3]). — Die von Hansen für die großen monoklinen Kristalle in Angiopteris angegebene Gipsnatur wird von Monteverde, Belzung u. a. bestritten, es soll sich um Oxalat handeln.

Das als schwer löslich bekannte Kalziumsulfat scheint bisweilen in den Zellen in Lösung gehalten zu werden. Wenigstens sind die Sphärokristalle, die sich in Marattiaceenblättern, welche monatelang in Weingeist gelegen haben, ausscheiden, nach Monteverde[4]) Gips. Hansen findet jedoch ,daß diese Ausscheidungen, die auch sechseckige Täfelchen bilden, aus Gips und aus Magnesiumsulfat bestehen. Sphäro-

mit Weingeist, der mit einigen Tropfen Salz- oder Salpetersäure versetzt ist, so sind die Schnitte mit Gipskristallen übersät, da der Stengel — getrennt — außer Sulfat auch Kalzium enthält.

[1]) Eine etwa im Reagens entstehende Trübung muß vor dem Gebrauch des Reagens durch Filtrieren beseitigt werden.

[2]) G. Klein, Der mikrochemische Nachweis von organisch gebundenem Schwefel und Magnesium in der Pflanze, Österr. bot. Zeitschr. 1927, LXXVI, S. 15.

[3]) Alfr. Fischer, Über d. Vorkommen von Gipskristallen bei den Desmidiaceen, Jahrb. f. wiss. Botanik, 1884, XIV, S. 133.

[4]) N. A. Monteverde, Über Kristallablagerungen bei den Marattiaceen, Bot. Centralbl., 1886, XXXIX, S. 358.

kristalle von Gips scheiden sich ferner bei Weingeistmaterial von Hebeclinium macrophyllum in den jugendlichen Holzzellen aus[1]) und Belzung[2]) traf beim Einlegen der Präparate in reines Glyzerin gelegentlich des Asparaginnachweises pinsel- und büschelartige Gipskristalle (Lupinus albus), und zwar in den Interzellularräumen an.

Verbreitet ist der Gips, wie H. Brunswik[3]) fand, bei den Tamaricaceen. Er kommt meist in Drusen von 12—35 μ vor, unter besonderen Umständen z. B. in den englumigen Markstrahlzellen auch als schön ausgebildete Einzelkristalle: Regelmäßige sechseckige oder rhombische Plättchen, manchmal mit abgerundeten Ecken. Sowohl diese als die Drusen (letztere fast regelmäßig) können einen dunklen Kern enthalten.

Die Gipskristalle sind ein Kristallexkret im Sinne Stahls.

Durch Umkristallisieren aus Wasser, dem Eosin oder Bismarckbraun zugesetzt ist, lassen sich die Kristalle unter Annahme der sog. Sanduhrstruktur färben (Maschke, Brunswik).

Der Gips konnte bei den Tamaricaceen in Stamm, Laubblatt, Blüte, Samenanlagen und Samen nachgewiesen werden. Lokalisation: Im Mesophyll, besonders längs den Blattnerven, in den einjährigen Zweigen, in Mark und Rinde, manchmal in den jungen Markstrahlen, in Mark und Rinde häufig in sklerenchymatischen Zellen. Manche Pflanzenteile, z. B. das Mesophyll von Reaumuria oder der Stengelfuß einjähriger Zweige von Tamarix sind unter Umständen dicht mit Gipskristallen angefüllt.

Schließlich sei noch auf das Vorkommen des Strontiansulfats als Skelettsubstanz der Radiolarie Acantharia hingewiesen.

Chlor

Chloride kommen überall im Boden vor und werden von den Pflanzen aufgenommen. Mangel an Chloriden führt in vielen Fällen Störungen im Stoffwechselprozeß herbei. Für Buchweizen und einige andere Pflanzen ist Chlor völlig entbehrlich. Diese Pflanzen schreiten auch in chlorfreien Lösungen zur Sam
Die Chloride wirken in bestimmten Konzentrationen als Reizmittel; werden (
überschritten, dann treten Giftwirkungen auf (P. Koenig). Meist bestimmt
den Gehalt an Chlor in der Asche. Dieser beträgt im Samen gewöhnlich 0,5—1,5%, im Samen der Kokosnuß aber 13,42%, der Rostkastanie 6,30%, des Mohnes 4,58% der Gesamtasche. Geringere Mengen Chloride kommen im Holze vor.

[1]) A. Hansen, Über Sphärokristalle, Arb. d. bot. Inst. Würzburg, 1885, III, S. 92.

[2]) E. Belzung, Exist. de l'oxal. de calc. á l'etat diss., Journ. d. Botan., 1894, VIII, S. 213.

[3]) H. Brunswik, Über das Vorkommen von Gipskristallen bei den Tamaricaceae, Sitzgsber. Wiener Akad. Wiss. Math. naturw. Kl. Abt. I, 1920, CXXIX, S. 115.

Auch hier gibt es, abgesehen von den auf stark chloridhaltigem Boden wachsenden Pflanzen, Ausnahmen, so hat das Holz von Aesculus hippocastanum bis 6%, das von Prunus mahaleb bis über 11% Chlor in der Asche. Ebenso verhält es sich mit der Rinde. Durch hohen Chlorgehalt zeichnen sich u. a. die Chinarinde und die Roßkastanie aus, in welchen er 3—5% der Gesamtasche betragen kann. Am meisten schwankt der Gehalt an Chloriden in den Blättern; man hat in der Asche mancher Blätter nur Spuren gefunden, in der anderer Blätter bis zu 25%; selbst der Chlorgehalt verschiedener Blätter der gleichen Pflanze schwankt. Der Chlorgehalt der Blätter, zu verschiedenen Zeiten bestimmt, zeigt keine Gesetzmäßigkeiten[1]). Größere Mengen finden sich in der Blüte, besonders in der Korolle. Im allgemeinen bevorzugen die Chloride nach Schimper in den Organen die grünen Gewebe. Die Blätter verschiedener Halophyten scheiden mit ihren Drüsen Chloride von Kalium, Natrium und Magnesium aus (Statice, Tamarix, Frankenia), wie von Schtscherback[2]) auf mikrochemischem Wege gezeigt wurde.

Jung[3]), der die Verbreitung des Chlors im Pflanzenreich studierte, fand nur wenige Pflanzen völlig chlorfrei.

Besonders chlorliebend sind: die Equisetaceen, Cannabaceen, Ulmaceen, Urticaceen, Euphorbiaceen, Polygonaceen, Chenopodiaceen, Amarantaceen, Aizoaceen, Cruciferen, Tamaricaceen, Malvaceen, Umbelliferen, Primulaceen, Compositen, Liliaceen, Iridaceen.

Chlorfeindlich sind: die Cyanophyceen und Chlorophyceen des Süßwassers, die Lichenes, Bryophyten, Lycopodiales, Filicales, Coniferen, Betulaceen, Salicaceen, Crassulariaceen, Rosaceen, Ericaceen und Orchideen.

Der mikrochemische Chlornachweis im Gewebe wurde von Schimper[4]) studiert, der Silbernitrat und Thalliumsulfat erprobte. Die Objekte dürfen zuvor nicht gewässert worden sein. Beim Nachweis mit Silbernitrat (1 : 20) schreibt Schimper vor, die Schnitte unter Deckglas mit dem Reagens zu versetzen, eintrocknen zu lassen und den entstandenen amorphen Niederschlag von Chlorsilber in einer Spur Ammoniak zu lösen. Man läßt wiederum eintrocknen und erhält nun Kristalle. Dieses zweimalige Eintrocknenlassen der Schnitte ist aber nicht nötig. Es empfiehlt sich folgender Gang: Die Schnitte, die mit einem reinen Messer angefertigt sind, werden auf ¼—1 Stunde in einen Tropfen Silbernitrat gelegt, ohne mit dem Deckglase bedeckt zu werden. Bei Gegenwart größerer Mengen Chlor sind die Fällungen makroskopisch sichtbar. Sie erscheinen käsigweiß, wenn man den Objektträger über eine weiße Unterlage hält, bei mikroskopischer Betrachtung fast

[1]) J. Vandevelde, Bull. Soc. Chim. Belg., 1909, XXIII, S. 84.

[2]) J. Schtscherback, Ber. d. bot. Ges., 1910, XXVIII, S. 30.

[3]) J. Jung, Über den Nachweis und die Verbreitung des Chlors im Pflanzenreiche. Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss. Math. nat. Kl., Abt. I, 1920, CXXIX, S. 297.

[4]) A. F. W. Schimper, Zur Frage d. Assimilation d. Mineralsalze d. die grüne Pflanze, Flora, 1890, LXXIII, S. 217.

schwarz und flockig bis körnig, doch auch bräunlich und gallertförmig, hautartig (Laminaria). Nach Bildung des Niederschlages wird ein Schnitt mit einem fein ausgezogenen Glasstäbchen aus der Silberlösung herausgenommen, auf einem zweiten Objektträger direkt in verdünnte Salpetersäure eingelegt und das Deckglas aufgelegt. Das Chlorsilber bleibt ungelöst, doch werden stärkehaltige Präparate weitgehend aufgehellt. Auf die anderen noch in der Silberlösung liegenden Schnitte wird Ammoniak bis zur Lösung des Niederschlages zugesetzt und das Deckglas aufgelegt. Innerhalb einiger Stunden hat sich das Chlorsilber nun in kristallinischer Form ausgeschieden. Man wird finden, daß die Ausscheidung bereits vollendet ist, wenn noch der halbe Raum unter dem Deckglas mit Flüssigkeit erfüllt ist. Das Ammoniak ist nämlich verdunstet, und Chlorsilber ist in der restierenden wässerigen Flüssigkeit unlöslich. Ein vollständiges Eindunsten der Lösung ist daher nicht erforderlich. Nur ein Teil der Kristalle entsteht in den Zellen. Ganz überwiegend sind es Kristalle von 10—25 μ Größe, reguläre Würfel, Oktaeder, Rhombendodekaeder und Kombinationen. Sie liegen einzeln oder zu Gruppen vereint. Besonders häufig sind Gruppen von 4 Kristallen (Würfel und Oktaeder). Nach längerer Zeit entstehen außerdem bis 70 μ große Kristalle von flacher tafelförmiger Gestalt (Fig. 31). Die Kristalle werden nach einigen Stunden tiefviolett bis schwarz, die großen Kristalle veilchenblau. Die Reduktion erfolgt bei den verschiedenen Objekten in verschieden langer Zeit (auch beim Liegen der Schnitte im Dunkeln), bei Laminaria in 10 Minuten, bei Daucus carota nach mehreren Stunden. Das Silberchlorid, sei es amorph oder kristallinisch, löst sich leicht in konzentrierter Quecksilbernitratlösung, Natriumhyposulfit, Ammoniak, Cyankalium, ist aber in verdünnten Säuren unlöslich. Die Kristalle leuchten im polarisierten Lichte nicht auf. Dem Chlorsilber in der Kristallform ähnlich sind die durch Silbernitrat entstehenden Fällungen der Arsenite und Arsenate. Gerade die aus 4 Kristallen bestehenden Gruppen sind für arsenigsaures Silber

Fig. 31. Laminaria Cloustoni (Längsschnitt), Chlornachweis mit Silbernitrat und Ammoniak (Tunmann)

ebenfalls typisch. Bei Wasserpflanzen (Meeresalgen) ist die Gegenwart mikrochemisch nachweisbarer Mengen von Arsenverbindungen vielleicht nicht völlig ausgeschlossen (vgl. dazu Arsen). In zweifelhaften Fällen werden die Chlorsilberkristalle noch nach Borodin identifiziert. Chlorsilberkristalle müssen in einer konzentrierten Lösung von Chlorsilber in konzentrierter Salzsäure oder Kochsalzlösung an Größe zunehmen. — Jederzeit zur Verfügung stehende Versuchsobjekte sind: Laminaria Cloustoni (Droge), Daucus carota (Wurzel), Beta, Solanum u. a.

Als Silberreagens empfiehlt Jung eine Lösung von 0,1 g Silbernitrat in 9,9 g 10proz. Ammoniak; bei sehr geringem Chlorgehalt eine Lösung von 0,05 g Silbernitrat in 9,95 g Ammoniak.

Läßt man nach Einlegen des Schnittes in einen Tropfen der Reagens das NH_3 möglichst ruhig verdunsten, so erhält man große Würfel, Oktaeder und kreuzförmige oder ordensternartige Drusen, die sich während der Beobachtung blau, violett bis schwarz färben.

Fig. 32. Chondrus crispus, Chlornachweis mit Thalliumsulfat (Tunmann)

Brunswik[1]) setzt dem Jungschen Reagens (1 % Silbernitrat 10 % Ammoniak) Methylenblau zu und erhält auf diese Weise im Schnitt selbst (z. B. bei Begonia- oder Primulablättern) sattblaue Silberchloridkristalle, zumeist in kleinen quadratischen Formen. Durch Waschen mit Weingeist und Salpetersäure kann der vom Schnitt gespeicherte Farbstoff entfernt werden, während die Silberchloridkristalle unverändert blau bleiben. Bei Gegenwart von Gerbstoffen kann man Methylenblau nicht verwenden, da es von diesen gefällt wird.

Außerdem läßt sich eine Lösung von Thalliumsulfat[2]) benutzen. Die Präparate werden direkt in das Reagens eingetragen. Nach einiger Zeit, zuweilen erst beim Eintrocknen, scheidet sich Thalliumchlorür in den Zellen in Oktaedern und in undeutlich ausgebildeten Kristallen des regulären Systems mit unebener, grubig punktierter Oberfläche aus, die in auffallendem Lichte grauweiß, in durchfallendem Lichte schwarz erscheinen. Diese Eigenschaft läßt sich zum Auffinden der

[1]) H. Brunswik, Über die Färbbarkeit der Silberchloridkristalle mit organischen Farbstoffen, Zeitschr. wiss. Mikrosk. 1921, XXXVIII, S. 150.

[2]) K. Haushofer, Mikr. Reaktionen, 1885, S. 125.

Fällungen in Geweben verwerten, indem man den Spiegel ab- oder horizontal stellt. Öfters entstehen körnige Gebilde, die nur wenige μ groß werden. Schöne Kristallformen erhält man bei Meeresalgen, bei Chondrus crispus bis 25 μ große Würfel (Fig. 32). Die Kristalle lösen sich in Wasser und nehmen bei der Prüfung nach Borodin auf Zusatz einer konzentrierten wässerigen Lösung von Thalliumchlorür an Größe zu.

An Stelle von Thallosulfat wandte Jung folgende Reagens an: Thalloacetat 0,5 g, Glyzerin 2 g, Wasser 7,5 g.

Zum mikrochemischen Nachweis der Chloride in der **Asche** zieht man die Asche mit etwas warmem Wasser aus und bringt an verschiedenen Stellen des Objektträgers, am besten in der Nähe der Ecken, einige Tropfen des Auszuges zur Verdunstung. Entstehung regulärer Würfel im Rückstand deutet auf Chlorkalium oder Chlornatrium hin. Auch in Milchsäften oder in dem ausgepreßten Saft frischer Pflanzen kann man durch Eintrocknenlassen die Chloride zur Kristallisation bringen. Zur Vorprobe auf wasserlösliche Kristalle benutzt man eine 70—80proz. wässerige Chloralhydratlösung. Im allgemeinen sind die Chloride (auch Bromide und Jodide), die Phosphate und die Salze organischer Säuren leicht in der hochprozentigen Chloralhydratlösung löslich, die Nitrate und Sulfate aber fast unlöslich. Auch wenn es sich um kristallinische Ausscheidungen in Weingeistmaterial handelt, gibt die Chloralhydratlösung Anhaltspunkte. — Über den Nachweis der Alkalimetalle in diesen Kristallen siehe unter Natrium, Kalium u. f.

Brom

Nach Sauvageau[1]) enthält die Floridee Antithamnionella sarniesis in einer voluminösen Vakuole (bromuque) eine strahlenbrechende homogene Masse, die freies Brom enthält. Der Nachweis erfolgt nach Zerplatzen des Brombehälters infolge Zugabe von destilliertem Wasser durch eine ammoniakalische Lösung von Fluoreszeïn.

Kylin[2]) ist der Ansicht, daß man bei sorgfältiger Prüfung geringe Mengen von Brom bei allen Meeresalgen auffinden könne. Unter den Phaeophyceen fand er es bei Desmarestia aculeata, unter den Rhodophyceen bei Polysiphonia urceolata, P. violacea, P. elongata, P. Brodiaei, P. nigrescens, Brongniartella byssoides, Rhodomela sulfurea, Rh. virgata und Odonthalia dentata.

Die wässerigen Auszüge von Trailliella intricata und Bonnemaisonia asparagoides enthalten außer Jodiden auch Bromide (Kylin).

[1]) Sauvageau, Über das Vorkommen von freiem Jod und Brom in Florideenalgen, Rép. de Pharmacie 1926, S. 6; nach Jahresber. d. Pharmazie 1926, LXI, S. 54.

[2]) H. Kylin, Über das Vorkommen von Jodiden, Bromiden und Jodidoxydasen bei den Meeresalgen, Zeitschr. physiol. Chem. 1929, CLXXXVI, S. 50.

Jod

Alles Jod der Pflanzen stammt in letzter Linie aus dem Urgestein. Aus diesem wird bei der Verwitterung fortwährend Jod herausgelöst, kommt so in den Boden, die fließenden Gewässer und das Meer. Das Jod des Meeres entweicht teilweise in elementarer Form und wird zum Teil wieder dem Festland zugeführt. Das Jod der Atmosphäre wird teilweise von den Pflanzen direkt aufgenommen, teils indirekt, nachdem es mit Tau, Regen und Schnee in die Erde gelangt ist. Süßwasser- und Meerespflanzen nehmen ebenfalls Jod auf (v. Fellenberg)[1].

Der Jodgehalt der Pflanzen ist abhängig von dem des Bodens. Düngung mit Jodid kann den Jodgehalt der Pflanzen steigern (Scharrer und Schwaibold, Köhler)[2].

Der Jodgehalt japanischer Algen ist hoch (Fucus vesiculosus 0,741, F. serratus, 0,7965, F. digitatus 1,2012, Laminaria saccharina 0,4174 %, Ossendowski). Laminaria Cl. von Helgoland zeigte große Schwankungen (0,096, 0,059, 0,108 % im Stengel, 0,143, 0,071, 0,124 % im Blatt, Tunmann).

Der Jodgehalt der Meeresalgen scheint mit der Jahreszeit zu wechseln. So fanden Okuda und Eto[3]) in Ecklonia bicyclis: Im Dezember 0,155 %, im Januar 0,178 %, im März 0,202 % und im Juni 0,348 % Jod.

Die jodreichste europäische Meeresalge ist Trailliella intricata mit 0,53 % Jod des Frischgewichts (Kylin). Besonders jodreich sind nach Dangeard: Halurus equisetifolius Kütz, Plumaria elegans, Bryopsis plumosa und B. hypnoides. (Cpt. rend. Acad. sciences 1929, CLXXXIX, S. 862.)

Weiteres über den Jodgehalt von Meeresalgen s. Kylin l. c. und Cameron (Journ. of Biol. Chem. 1914, XVIII, 1915, XXIII. Hendrices, Journ. soc. chem. ind. 1916, XXXV; Beckmann u. Bark, Sitzgsber. Berl. Akad. Wissensch., 1916.

E. Winterstein[4]) fand in 5 von 38 untersuchten Phanerogamen Spuren von Jod: Beta vulgaris, Solanum tuberosum, Apium graveoleus, Lactuca sativa, Daucus carota. In einigen Pilzen wurde kein Jod gefunden.

v. Fellenberg hat bei einer großen Zahl von Pflanzen, insbesondere Nahrungs- und Genußmitteln, den Jodgehalt bestimmt.

---

[1]) v. Fellenberg, Das Jod, Mikrochemie, 1929, VII, S. 242.

[2]) K. Scharrer und J. Schwaibold, Untersuchungen einiger Kulturpflanzen auf ihren natürlichen Jodgehalt und dessen Steigerung durch Joddüngung. Biochem. Zeitschr. 1927, CLXXXV, S. 405; R. Köhler, Zur Kenntnis des Jods in Boden und Pflanze, Zeitschr. angew. Chem., 1929, XLII, S. 192; auch K. Scharrer und A. Strobel, Die Jodanreicherung der Pflanzen durch Jodzufuhr, Angew. Botan., 1927, H. 2.

[3]) J. Okuda u. P. Eto, On the form of iodine in marine algae. Journ. Coll. Agr. imp. Univ. Tokyo, 1916, V, S. 341, nach Bot. Centralbl. 1917, CXXXV, S. 251.

[4]) E. Winterstein, Über das Vorkommen von Jod in Pflanzen, Zeitschr. physiol. Chem., 1918, CIV, S. 54.

Höhere Werte als sie v. Fellenberg bei schweizer Pflanzen fand, ermittelte Heymann[1]) bei Pflanzen aus der Nähe der holländischen Küste. Er fand bei Strandhafer je nach dem Standort 800—3400 γ im kg, bei Brennessel 500—2600 γ, bei Adlerfarn 900 γ.

Der Jodgehalt der Lebensmittel des Danziger Gebietes ist beträchtlich höher als der der schweizerischen.

Die äußeren Schichten des Getreidekorns sind jodreicher als die inneren.

(E. Glimm, Weitere Untersuchungen zum Jodproblem. Biochem. Zeitschr., 1930, CCXIX, S. 148.)

Die Verteilung des Jods in der Pflanze hat v. Fellenberg[2]) bei Helianthus tuberosus und Helianthus annuus studiert. „Das Jod ist auf alle Organe verteilt. Absolut enthalten die Blätter bei beiden Pflanzen am meisten, dann kommen die Stengel und Blüten, darauf die Wurzeln und Knollen. Auf das Kilogramm frische Substanz bezogen, sind hingegen die Stengel weitaus am jodärmsten." —

Beispielsweise enthielten die Blätter von Helianthus tuberosus 29 γ Jod im kg, die Stengel 3 γ, die Wurzeln 22 γ, die Knollen 12 γ.

Jodhaltige Phaeophyceen[3]): Laminaria Cloustoni, L. digitata, L. saccharina, Desmarestia aculeata und Dictyosiphon hippuroides; weniger jodreich sind Ascophyllum nodosun, Fucus serratus, Chordaria flagelliformis, jodarm: Chorda filum, Ch. tomentosa, Desmarestia viridis (Kylin); Halidrys siliquosa[4]), Clodostephus verticillatus, Cl. spongiosus (Molisch).

Jodhaltige Rhodophyceen: Trailliella intricata, Bonnemaisonia asparagoides, Plumaria elegans, Ptilota plumosa (Kylin).

Unter den Chlorophyceen fand Kylin Jod in Cladophora rupestris und Acrosiphonia pallida, Cameron in Ulva lactuca, Enteromorpha compressa, Monostroma fuscum.

Spuren von Jod fand Kylin in der Cyanophycee Calothrix scopulorum.

Die Jodide sind bei den Laminaria-Arten besonders in den 3—4 äußeren Zellschichten angehäuft, in deren Vakuolen wenigstens 1 % Jodide vorkommen.

Bei den Laminaria-Arten ist die Zuwachszone reicher an Jod als das Blatt, bei Fucus vesiculosus, F. serratus und Ascophyllum nodosum sind die Sproßspitzen etwas jodreicher als die älteren Thallusteile.

Beim Absterben der oberirdischen Pflanzenteile wird das Jod nicht in die Wurzel zurückgezogen. Vermodernde Blätter geben es nur sehr langsam ab.

[1]) J. A. Heymann, Jodium in het waterleiding bedrijf, Water en gas, 1925, Nr. 4.

[2]) Th. v. Fellenberg, Das Vorkommen, der Kreislauf und der Stoffwechsel des Jods, Ergebnisse der Physiologie, 1926, XXV (auch als Sonderausgabe).

[3]) H. Kylin, Über das Vorkommen von Jodiden, Bromiden und Jodidoxydasen bei den Meeresalgen, Zeitschr. physiol. Chem., 1929, CLXXXVI, S. 50.

[4]) Von Kylin nicht bestätigt.

Über die Formen, in der das Jod in den Pflanzen vorkommt, sind wir noch nicht genügend unterrichtet.

van Itallie (Arch. Pharmazie 1889, CCXXVII, S. 1133) glaubte aus seinen Versuchen den Schluß ziehen zu können, daß das Jod in Fucus vesiculosus als Jodid anwesend ist, nach Eschle (Zeitschr. physiol. Chem. 1897, XXIII, S. 37) ist das Jod bei Laminaria digitata und Fucus vesiculosus fast ausschließlich in organischer Bindung vorhanden, während Tsukomota und Furukowa bei den Phaeophyceen für hauptsächlich anorganische Bindung eintraten. Okuda und Eto fanden aber bei den Phaeophyceen hauptsächlich organische in Wasser, Weingeist, verdünnten Alkalien und Säuren lösliche Verbindungen (Journ. Coll. Agric. 1916 V nach Kylin, 1929). Kylin wies das Vorkommen von Alkalijodiden bei Ascophyllum nodosum, Fucus serratus, F. vesiculosus, Laminaria Cloustoni, L. digitata und L. saccharina nach[1]).

Bei den Arten vom Bonnemaisonia-Typus gibt es zwei verschiedene Arten von Jodverbindungen, die Jodide in den normalen Zellen und eine unbekannte bei saurer Reaktion leicht Jod abspaltende Verbindung in den Blasenzellen (Sauvageau, Chemin, Mangenot, Dangeard, Kylin). Gegenüber der Ansicht von Sauvageau, daß die Blasenzellen freies Jod enthalten, sind Chemin und Kylin der Ansicht, daß es sich um eine Jodverbindung handle.

Kylin hat 1928 den jodabspaltenden Stoff aus Falkenbergia Hillebrandii, Bonnemaisonia asparagoides und Trailliella intricata extrahiert, letzterer wird schon beim Konzentrieren auf dem Wasserbad zerstört.

Bei den Arten vom Laminaria-Typus ist das Jod hauptsächlich in Form von Jodiden gebunden.

Golenkin[2]) behauptete schon 1894 das Vorkommen von freiem Jod für die Rhodophycee Bonnemaisonia asparagoides, wo es in den Vakuolen eigentümlicher Zellen vorkommen soll. Sauvageau[3]) gibt für die Alge Asparagosis armata besondere Jodbehälter an, nach deren Zerstörung durch Druck oder destilliertes Wasser freies Jod austritt.

[1]) H. Kylin, Arkiv för Botanik, 1912, XI; 1915, XIV; Untersuchungen über die Biochemie der Meeresalgen, Zeitschr. physiol. Chem., 1915, XCIV, Arkiv för Botanik, 1917, XIV; Botan. Notiser, Lund, 1927 u. 1928.

[2]) Golenkin, Algologische Notizen, Bull. soc. d'hist. nat. de Moscou, 1894, S. 297.

[3]) Sauvageau, Über das Vorkommen von freiem Jod und Brom in Florideenalgen, Rép. de Pharmacie nach Jahresber. d. Pharmazie, 1926, LXI, S. 54.

Nach Dangeard[1]) geben Fucus vesiculosus f. evesiculosus und Laminaria-Arten und andere Meeresalgen in lebendem Zustand Jod nach außen ab. Nach Sauvageau enthält auch Falkenbergia Doubletii freies Jod. Dies wird von Chemin und Legendre[2]) bestritten, die das Auftreten von Jod erst nach dem Ansäuern beobachteten und der Ansicht sind, daß das Jod in sehr labiler Form vorhanden sei. Eine labile Jodverbindung enthalten nach Kylin auch die Blasenzellen von Bonnemaisonia asparagoides und Spermothamnion roseolum, aus denen beim Absterben Jod frei wird.

Freundler[3]) schließlich spricht von einem „iode dissimulé", das sich in lebenden Laminarien findet und unter bestimmten Bedingungen in Jod übergeht.

In Ecklonia bicyclis sind von 100 Teilen Jod in anorganischer Form weniger als 5 %; von den bleibenden 95 % sind 5 % in unlöslicher Form (Protein ?) von den 90 % löslichen 85 % nicht in Eiweißform vorhanden (Okuda u. Eto). Auch in anderen Algen findet sich das meiste Jod in organischer Form. Andererseits kann aber auch kein Zweifel darüber sein, daß das Jod in den Laminarien mindestens zum Teil in anorganischer Form vorliegt.

Das organisch gebundene Jod herrscht nach v. Fellenberg bei den meisten Pflanzen bei weitem vor.

In Laminaria digitata beträgt der leicht- (wasser- und weingeist-) lösliche Teil des Jods in den Stengeln etwa 95 % des Gesamtjods, in den Blättern 93 %, in den Wurzeln 61,5 %. Davon ist die Hauptmenge als Jodid oder jodidartig vorhanden. Die Menge der unlöslichen Jodverbindungen ist in den Wurzeln außerordentlich viel größer, als in den Stengeln und Blättern. Auch scheint das Jod in den Wurzeln anders gebunden als in den übrigen Teilen der Pflanze, da es sich im Gegensatz zu jenem auch mit siedender Salzsäure nur zum Teil in Lösung bringen läßt.

(G. Lunde u. K. Closs, Biochem. Zeitschr. 1930, CCXIX, S. 198.)

Stocklasa[4]) schreibt dem Jod wichtige Funktionen zu. Es soll bei den Halophyten und manchen anderen Pflanzen den gesamten Kraft- und Stoffwechsel erhöhen. Es soll ferner, besonders in Gegenwart von Eisen und α-Strahlen

[1]) P. Dangeard, Contribution á la connaissance du cycle de l'iode chez les algues marines. Le Botaniste, 1928, XX, S. 69. Derselbe, L'iodovolatilisation chez les Algues marines et les problèmes de l'iode, Le Botaniste 1929, XXI, S. 129.

[2]) E. Chemin u. B. Legendre, Observations sur l'existence de l'iode libre chez Falkenbergia Doubletii Sauv. Compt. rend. Acad. sciences, Paris 1926, CLXXXIII, S. 904.

[3]) G. Freundler (mit J. Ménages, Y. Laurent u. Y. Lelièvre), L'iode dissimulé des Laminaires (I), Bull. soc. chim. France, 1925 (4), XXXVII, S. 1466.

[4]) J. Stocklasa, Die physiologische Funktion des Jods beim Bau- und Betriebsstoffwechsel in der chlorophyllhaltigen und chlorophyllosen Zelle, Biochem. Zeitschr., 1926, CLXXVI, S. 38.

der Radiumemanation, die oxydativen Phasen der Mechanik der Atmungsprozesse bedeutend fördern und im Pflanzenorganismus die Bildung der Furfuroide, namentlich aus der Saccharose unterstützen. Außerdem soll es die Wasserstoffionenkonzentration in der Pflanze herabsetzen.

Justus[1]) glaubte Jod in den Zellkernen der Knospen von Fraxinus nachgewiesen zu haben. Die Präparate des in Weingeist fixierten und in Zelloidin eingebetteten Materials werden durch Waschen mit Wasser vom Weingeist befreit und 1—2 Minuten mit Chlorwasser behandelt. Nun kommen die Schnitte auf mehrere Stunden in eine 0,01proz. Silbernitratlösung, dann wird durch 24stündige Mazeration mit konzentrierter Kochsalzlösung das Silberchlorid ausgewaschen. Nachdem man die Präparate mit Wasser abgespült hat, gelangen sie in eine 3—5proz. Quecksilberchloridlösung, um das Silberjodid in rotes Quecksilberjodid überzuführen, welches in konzentriertem Glyzerin (mehr oder weniger gut) sichtbar ist. Tunmann erschien es vorteilhaft, das Auswaschen mit der Kochsalzlösung 2 Tage lang fortzusetzen und die Lösung einmal zu erneuern. Auch erwies sich eine 2proz. Quecksilberchloridlösung am geeignetsten. Stärkere Sublimatlösungen geben mehr chromgelbe Färbungen. Die Zellwände blieben bei Laminaria, wo Tunmann das Verfahren nachprüfte, farblos, die Chromatophoren zeigten die besten Färbungen, weniger gut bei Fucus Zellkern und Plasma. Wenn sich das Jod bei dieser Reaktion auf organisierte Zellbestandteile niederschlägt, so ist dies noch kein einwandfreier Beweis für eine Lokalisation des Jods in Zellkern und Chromatophor, zumal der austretende Schleim Jodreaktion gibt. J. Babig[2]) konnte in keinerlei Weise Jod im Zellkern nachweisen und ist der Ansicht, daß die bei Braunalgen beobachteten Färbungen von postmortal entstandenen Phycophaeïn herrühren.

Makrochemisch gelang Flückiger[3]) der Jodnachweis noch mit 0,1 g der Laminariadroge. Er röstete die gepulverte Substanz unter Zusatz der doppelten Menge Bimsstein vorsichtig bis zur Verkohlung, nahm die Masse mit Wasser auf und wies das Jod im Filtrat, nach Ansäuern mit Ferrichlorid, durch Ausschütteln mit Schwefelkohlenstoff nach, der sich violett färbte. In ähnlicher Weise konnte van Itallie[4]) in 10 g Chondrus crispus den Jodnachweis erbringen und zwar in den mit Wasser und 50proz. Weingeist erhaltenen Auszügen.

[1]) J. Justus, Über den physiologischen Jodgehalt der Zelle, Virchows Arch. 1902, CLXX, S. 501.

[2]) J. Babig, Über das angeblich konstante Vorkommen von Jod im Zellkern, Ber. deutsch. bot. Ges., 1913, XXXI, S. 35.

[3]) F. A. Flückiger, Nachw. d. Jods in Laminaria, Arch. d. Pharm., 1887, CCXXV, S. 519.

[4]) L. van Itallie, Über das Vorkommen von Jodium in Fucus vesiculosus und Chondrus crispus, Arch. d. Pharm., 1889, CCXXVII, S. 1132.

Einfacher und sicherer ist bei Laminaria der mikrochemische Nachweis. Den in Wasser liegenden Präparaten fügt man einige Stärkekörnchen zu und läßt vom Deckglasrande 1—2 Tropfen Ferrichlorid[1]) (offizinelle Lösung) einwirken. Es ist ratsam, mehrere Präparate, welche aber ganz zart sein können, unter ein Deckglas zu bringen. Das frei gewordene Jod färbt die Stärkekörner tief blau, die schönste Färbung zeigen die nahe dem Deckglasrande liegenden Körner. Die Reaktion, die innerhalb ¼ Stunde den Höhepunkt erreicht, tritt noch mit 0,001 g der Droge ein und mit 0,01 g lebenden Materials. Bei Benutzung von 0,01 g Droge und Anwendung reichlicher Stärke ist die Blaufärbung mit bloßem Auge wahrnehmbar. Unter Berücksichtigung der mit gleichem Material ausgeführten quantitativen Bestimmungen und der Vergleichsversuche mit Kaliumjodidlösungen von bestimmtem Gehalt gelingt es mit dieser Methode, noch 0,0005 mg Jod nachzuweisen. Der Nachweis gelingt auch mit 0,02 g des aus der Schnittfläche eines gut gereinigten frischen Laminariastengels austretenden Schleimes. Frisches Material ist gut vom (jodhaltigen) Meerwasser zu befreien. Die die Reaktion bedingenden Jodverbindungen lassen sich innerhalb 24 Stunden mit Wasser oder Alkohol den Geweben (Schnitten) entziehen. Bei Florideen (Chondrus crispus, getrocknetes Material, Droge) trat die Reaktion nicht immer ein und nur bei Anwendung von Präparaten im Gesamtgewicht von 0,5—1,0 g. Die Jodamylumreaktion gibt nur bei jenen Pflanzen positive Resultate, bei denen die Jodverbindungen in relativ größerer Menge vorhanden sind.

Die Reaktion wird empfindlicher, wenn man statt Ferrichlorid Jodsäure benutzt[2]), auch als Kaliumjodat + Säure (Wasicky und Stern). Molisch[3]) erbringt den Nachweis von Jod in Laminaria digitata in folgender Weise: Dünntrockene Späne werden in eine Glaskammer auf den Objektträger gebracht und mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure[4]) befeuchtet. Die Glaskammer wird mit einem Deckgläschen bedeckt, auf dessen Unterseite man in ein Tröpfchen Wasser Spuren von Stärke gebracht hat.

Für den Nachweis freien Jods genügt natürlich der Zusatz von Stärke. Aus den unbeständigen Jodverbindungen (s. oben) soll das

[1]) Tunmann, Über das Jod und den Nachweis desselben in der Laminaria, Pharm Centralh., 1907, XLVIII, S. 505.

[2]) Bei der Anwendung von Jodsäure ist Vorsicht geboten, da durch manche reduzierende Stoffe aus Jodsäure Jod frei wird (durch Reaktion des zunächst entstehenden Jodwasserstoffs mit der Jodsäure).

[3]) Nach J. Babig (l. c.).

[4]) Steiner (Mikrochemie, 1929, VII, S. 265) empfiehlt 5—10proz. Salpeter-

Jod u. a. durch Säuren, Temperaturerhöhung, Salze u. a. m. frei gemacht werden[1]).

Kylin bringt auf einen Objektträger eine Mischung von verdünnter Salzsäure, Wasserstoffperoxyd und Kartoffelstärkekleister und legt in diese Mischung Schnitte oder kleine Thallusteile von den zu prüfenden Algen. Die Reaktion wird während 5 bis 10 Minuten verfolgt und die Blaufärbung auf weißem Papier ohne Mikroskop beobachtet.

Trailliella intricata und Bonnemaisonia asparagoides spalten ohne Wasserstoffperoxyd Jod ab.

Hintzelmann benutzt zum histochemischen Nachweis des Jods in tierischen Geweben eine Lösung von 1 g Thalloazetat in 100 ccm verdünntem Formaldehyd; im Gewebe bilden sich gelbe Kristalle von Thallojodid. Sie werden von Wasser und Weingeist leicht herausgewaschen.

(U. Hintzelmann, Eine Methode zum histochemischen Nachweis von Jod, Ztschr. wiss. Mikrosk. 1929, XLVI, S. 486.)

Dangeard bringt ein Bruchstück der frischen Alge oder einen Schnitt auf stärkehaltiges Papier, befeuchtet mit einigen Tropfen 5proz. Schwefelsäure oder Salzsäure und 20proz. Natriumnitritlösung. Bei Gegenwart von Jod färbt sich das Papier blau. Über die damit jodhaltig gefundenen Algen siehe P. Dangeard, Le botaniste 1930, XXII, S. 33. Hervorzuheben ist der starke Jodgehalt der Diatomee Schizonema.

Zum Nachweis der freies Jod erzeugenden Schicht der Laminarien bringt Dangeard einen dünnen Querschnitt in eine Suspension von Stärke in einem Tropfen Meerwasser und schützt den Schnitt vor dem Druck des Deckglases indem er zwischen Objektträger und Deckglas einen Papierstreifen anbringt (Le Botaniste 1929, XXI, S. 127, bes. S. 153).

Wenig empfindlich ist der Nachweis von Jod durch Kresylblau (Sauvageau, Chemin, Mangenot, Dangeard), wenn er sich darauf beschränkt, das Auftreten roter Kristalldrusen (Jodid des Farbstoffes) festzustellen. Man kann dann noch Wasserstoffperoxyd zusetzen: die roten Kristalldrusen verfärben sich dann ins Grüne (Kylin).

Mangenot benutzte die Reaktion mit Kresylblau, die er entgegen Chemin empfiehlt zur Feststellung der Lokalisation des Jods in Laminaria-Arten, einigen Fucaceen, Dictyota und Ectocarpus. Die Kristallbüschel entstehen stets in den Vakuolen an der Vakuolenwand;

[1]) E. Chemin und R. Legendre, Observations sur l'existence libre chez Falkenbergia Doubletii Saur. Compt. rend. Acad. sciences, CLXXXIII, S. 904.

es ist aber nicht sicher, ob die Jodverbindungen in den Schichten fehlen in denen keine Reaktion auftritt.

(G. Mangenot, Sur le localisation des iodures daus les cellules des Algues, Bull. soc. bot. France 1928, LXXV, S. 519.)

Chemin (Bull. soc. bot. France 1929, LXXVI, S. 1009) und Dangeard (Le Botaniste sér. XXI) sprechen sich gegen die Verwendung von Kresolblau als Reagens auf Jodide aus, da die Reaktion wenig empfindlich ist und auch mit anderen Stoffen eintreten kann.

Fluor

Fluor ist im Pflanzenreich allgemein verbreitet[1]). Pflanzenmikrochemisches ist nicht bekannt.

Stickstoff (Nitrate, Nitrite, Hydroxylamin)

Als Stickstoffquellen für die Eiweißproduktion dienen den Pflanzen Ammoniumverbindungen, in bestimmten Fällen der Stickstoff der Luft, vor allem aber die Nitrate des Bodens. Nitrite, die sich zwar beim Mais den Nitraten gegenüber als gleichwertige Düngungsmittel erwiesen[2]), sind für keimende Samen mehr oder weniger giftig. Ältere, aber noch in Entwicklung begriffene Pflanzen sind gegen mäßige Nitritmengen unempfindlich[3]). Die Nitrate gelangen aus dem Boden in die Leitungsbahnen und werden bei der Eiweißsynthese verarbeitet, wahrscheinlich, doch nicht ausschließlich, in den Blättern, nach Schimper in den Chlorophyllkörnern. Bis zu einem gewissen Grade sind alle Organe befähigt, Nitrate zu verarbeiten. In den Wurzeln ist die Nitratreaktion einige Millimeter oberhalb der Wurzelhaarzone noch gut zu erhalten. Doch dringen die Nitrate nicht so schnell in die Wurzelhaare ein, wie einige Farbstoffe (Methylviolett)[4]).

Im Stengel kommen Nitrate ziemlich gleichmäßig vor. Bei krautigen Pflanzen nehmen sie im Allgemeinen nach oben ab (Molisch). Die Hauptmenge wird in den parenchymatischen Zellen gespeichert; meist sind die zentralen Teile reicher als die peripheren. Bei Phaseolus multiflorus, Cucurbita pepo (Hypokotyl) und Lupinus albus sind indes die peripheren Teile nitratreicher als das Mark (Klein).

In den Blättern findet man Nitrat nur bei daran sehr reichen Pflanzen im Mesophyll, sonst nur in der Nähe der Gefäßbündel (Molisch, Frank, Schimper). Die Blüten enthalten nur bei sehr nitratreichen Pflanzen Nitrat, so bei Tradescantia hypoleuca, Dianthus, Salvia officinalis, Chelidonium majus und Antirrhinum majus (Klein). Absolut nitratfrei sind Meristeme, Pollenkörner und Samenanlagen (Schimper, Klein).

---

[1]) A. Gautier und P. Clausmann, Le fluor dans le règne végétal, Compt. rend. Acad. sciences Paris, 1916, CLXII, S. 105.

[2]) Th. Schloesing fils, Nitrates et Nitrites pour engrais, Compt. rend., 1905, CXLI, S. 745.

[3]) A. Stutzer, Wirkung von Nitrit auf Pflanzen, Journ. f. Landw., 1906, LIV, S. 125.

[4]) L. Kny, Über den Ort der Nährstoffaufnahme durch die Wurzel, Ber. deutsch. bot. Ges., 1898, XVI, S. 216.

Typische Salpeterpflanzen (in erster Linie zu mikrochemischen Studien geeignet) sind Zea mays, Phaseolus multiflorus, Cucurbita pepo, Helianthus annuus, ferner Beta vulgaris, Solanum tuberosum, Solanaceen (Atropa belladonna, Datura), viele Boragineen und nach Lutz Urticaceen, Chenopodiaceen, nicht Malvaceen und Kryptogamen (Moose).

Zur Untersuchung ist tunlichst lebendes Material heranzuziehen, da der Nitratgehalt beim Trocknen, wie Couperot[1]) zeigte, infolge enzymatischer Prozesse um $\frac{1}{3}$, selbst um $\frac{1}{2}$ abnimmt. Von den zahlreichen in der Chemie benutzten Reaktionen auf Salpetersäure und Nitrate wurde in der Pflanzenmikrochemie lange die Reaktion mit Diphenylamin am meisten herangezogen. Zum Nachweis wird eine Lösung von 0,05—0,1 g Diphenylamin in 10,0 g konzentrierter Schwefelsäure benutzt (Molisch)[2]). Die frischen Schnitte kommen direkt in das Reagens oder aber man läßt die Präparate zuvor auf dem Objektträger eintrocknen und fügt dann das Reagens zu. Bei Gegenwart von Nitraten erfolgt sofort Blaufärbung, die nach kurzer Zeit in ein schmutziges Braungelb übergeht. Eingehend wurde die Reaktion von Müller[3]) und Serño[4]), speziell zur Unterscheidung von Kaliumnitrat und Asparaginkristallen, benutzt. Letzterer wandte eine 2proz. Lösung von Diphenylamin an. Die konzentrierte Schwefelsäure zerstört die Präparate ziemlich schnell; um sie länger zu erhalten, kann man eine etwas verdünnte Säure anwenden, etwa drei Teile Säure und ein Teil Wasser, bei stärkerer Verdünnung tritt nach Tunmanns Befunden aber keine Reaktion mehr ein. Gegen die Diphenylamin-Reaktion hat man, vorzüglich in der botanischen Literatur, geltend gemacht, daß sie auch zugleich salpetrige Säure und Nitrite anzeige. Nun hat Soltsien[5]) gezeigt, daß die Reaktion gar nicht durch salpetrige Säure und Nitrite veranlaßt werden kann. Im Gegenteil vermag die Gegenwart von viel salpetriger Säure neben Spuren von Salpetersäure sogar das Eintreten der Reaktion zu verhindern. Das gleiche läßt sich, wie schon hier bemerkt sei, bezüglich der Brucinreaktion sagen.

Blaufärbung mit Diphenylamin geben noch verschiedene Substanzen, wie Bromsäure, Jodsäure, Wasserstoffperoxyd, chromsaures

[1]) Couperot, Compt. rend., 1909, CXLIX, S. 957.

[2]) H. Molisch, Über den mikrochem. Nachweis von Nitraten und Nitriten in der Pflanze mittels Diphenylamin oder Brucin, Ber. deutsch. bot. Ges., 1883, II, S. 150.

[3]) C. O. Müller, Ein Beitrag zur Kenntnis der Eiweißbildung in der Pflanze, Dissertation, Leipzig 1886.

[4]) Serno, Über das Auftreten und das Verhalten der Salpetersäure in den Pflanzen, Landw. Jahrb., 1889, S. 877.

[5]) P. Soltsien, Pharm. Ztg., 1906, LI, S. 765.

Kali, Eisenoxydsalze, Mangansuperoxyd, chlorsaures Kali)[1]. Diese sind aber praktisch wenig von Belang, da die meisten der genannten Stoffe nicht in Pflanzen vorkommen. Anderseits wird die Reaktion durch noch unbekannte Substanzen und Ursachen zuweilen verhindert. So fanden schon Molisch und Schimper[2]), daß verholzte Elemente keine Blaufärbung geben, auch wenn sie einen großen Nitratgehalt aufweisen. In solchen Fällen kommt man, wie Ellram[3]) zeigte, der ebenfalls die Diphenylaminreaktion für die beste hält, zum Ziele, wenn man vor der Ausführung der Diphenylaminprobe erst die Ligninreaktion mit Phloroglucin-Salzsäure ausführt. Auch in chlorophyllhaltigen Geweben soll die Reaktion oft ausbleiben, selbst bei Anwesenheit reichlicher Nitratmengen (Lutz)[4]).

Benutzt wird ferner die ebenfalls von Molisch in die Mikrochemie eingeführte Reaktion mit Brucin-Schwefelsäure, einer Lösung von 0,2 g Brucin in 10 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure. Nitrathaltige Zellen werden intensiv rot gefärbt. Die Färbung verblaßt nach einiger Zeit. Die Reaktion ist nicht so scharf wie die Diphenylaminprobe.

Arnaud und Padé[5]) benutzten zum Nachweis Cinchonamin. Sie legten die Schnitte in eine mit Salzsäure angesäuerte 0,4proz. wässerige Lösung von salzsaurem Cinchonamin. In Nitrat-Zellen gelangen Kristalle von salpetersaurem Cinchonamin zur Abscheidung (rechtwinklige, sechsseitige Täfelchen, Behrens).

Ein wertvolles, wenn auch mit Vorsicht (s. unten) zu benützendes Reagens auf Nitrate ist das Nitron Buschs[6]) (Diphenylendanilodihydrotriazol). Es wurde in der pflanzlichen Mikrochemie zuerst von Fluri[7]) angewandt. Fluri hat bei Anwendung einer 10proz. Nitronlösung in

---

[1]) B. Frank, Unters. über die Ernährung der Pflanze mit Stickstoff, Landwirtsch. Jahrb., 1888, XVII, S. 421 und Bemerkungen hierzu, S. 723; ferner Kreusler, Zum Nachweis von Nitraten im Erdboden, Landwirtsch. Jahrb., 1888, XVII, S. 721.

[2]) A. F. W. Schimper, Flora, 1890, LXXIII, S. 218.

[3]) W. Ellram, Über den mikrochemischen Nachweis von Nitraten in den Pflanzen, Dorpater Sitzgsber., 1895, XI, Bot. Centralbl., 1896, LXVII, S. 74.

[4]) L. Lutz, Sur l'accumulation des nitrates dans les plantes parasites et saprophytes et sur l'insuffisance de la diphénylamine sulfurique comme réactif microchimique de ces substances, Bull. Soc. bot. France, 1909, XLV, S. 104.

[5]) A. Arnaud und L. Padé, Rech. chim. de l'acide nitrique, des nitrates dans les tissus végétaux, Compt. rend., 1884, XCVIII, S. 1488.

[6]) P. Busch, Chem. Centralbl., 1905, I, S. 900 und: Die Fällung der Salpetersäure mittels Nitron, Zeitschr. f. analyt. Chem., 1909, XLVIII, S. 375.

[7]) M. Fluri, Der Einfluß von Aluminiumsalzen auf das Protoplasma, Flora, 1908, XCIX, S. 85.

5proz. Essigsäure weiße Nadeln erhalten. Die Versuche erstreckten sich aber nur auf Spirogyren, die mit Salpeter plasmolysiert waren. Die Niederschläge entstanden nur in der Salpeterlösung, niemals in den Zellen. Später hat R. Klein[1]) den Nachweis von Nitraten mit Nitron eingehend studiert. Verwendet wird im allgemeinen eine 10proz. Lösung des Nitrons in 5proz. Essigsäure, bei sehr nitratreichen Pflanzen, wie Tradescantia. eine 5proz. Nitronlösung. Eine Unterscheidung von Nitrit und Nitrat ist nicht möglich, wohl aber von Oxalaten, die ebenfalls eine unlösliche Nitronverbindung geben durch Berücksichtigung folgender Eigenschaften:

Nitrat.	Oxalat.
Nadeln mit stumpfen Enden und Büschel; nach dem Umkristallisieren lange stumpfe Nadeln. Im polarisierten Licht lebhafte Interferenzfarben, besonders nach dem Umkristallisieren.	Es entsteht zuerst eine Gallerte, welche sich allmählich in lange spitze Kristalle und Büschel umwandelt. Nur sehr dicke Kristalle zeigen manchmal stumpfe Enden. Nach dem Umkristallisieren große gefiederte Büschel. Doppelbrechung, keine Interferenzfarben. Gerade Auslöschung. Der bei Gegenwart von wenig Oxalsäure entstehende gallertige Niederschlag besteht aus kugeligen Flocken mit schwarzem Polarisationskreuz.

Außer mit Oxalaten und Nitraten gibt Nitron noch mit einer ganzen Anzahl von Stoffen Fällungen, von denen allerdings die wenigstens in den Pflanzen vorkommen. Man vermeidet fast jeden Irrtum, wenn man die Präparate nach Absaugen der Flüssigkeit mit Diphenylamin-Schwefelsäure (s. oben) behandelt[2]).

Ein weiteres Fällungsreagens für Nitrate ist das (α-Dinaphthomethyl)-amin (Rupes Reagens). Eine 10proz. Lösung in 50proz. Essigsäure läßt mit Nitraten Büschel oder Sterne feiner Nadeln entstehen, die das Nitrat der Base sind. Da auch nooh andere Salze (Oxalat, Chlorid, Bromid, Jodid u. a.) schwerlöslich sind, so prüft man, wie bei Nitron (s. oben) noch mit der Diphenylamin-Schwefelsäure-Reaktion nach.

Kaliumnitrat kommt sehr häufig im Gewebe vor und ist nach dem Gesagten leicht nachzuweisen. Die Schnitte kommen auf dem Objektträger in etwas Weingeist. Nach Verdunsten des Weingeists scheiden sich die Salpeterkristalle in rhombischen Tafeln, zuweilen

[1]) R. Klein, Über Nachweis und Vorkommen von Nitraten und Nitriten in Pflanzen, Beihefte z. bot. Centralbl., 1913, XXX, Abt. 1, S. 141.

[2]) L. Rosenthaler, Über den mikrochemischen Nachweis von Nitraten in Drogen, Pharmazeut. Ztg., 1929, LXXIV, S. 75.

auch in Prismen aus (Abb. unter Asparagin). Beim Einlegen der Objekte in Glyzerin erfolgt die Ausscheidung nach Belzung (S. 122, Anm. 2) auch in den Interzellularräumen. Die Kristalle werden auf Salpeter, säure mit Diphenylamin-Schwefelsäure oder in anderer Weise geprüft. der Kaliumgehalt kann nach dem bei Kalium (s. d.) angegebenen Verfahren ermittelt werden.

Nitrite kommen, soweit bekannt, verhältnismäßig selten in höheren Pflanzen vor. Die Angaben über ihr Vorkommen im Saft der Fuchsienstengel und im Stengelsaft von Urtica[1]) bedürfen wohl der Nachprüfung. In den Blättern einer Erythrina soll salpetrige Säure nach Weehuizen[2]) in glykosidartiger Bindung vorkommen. R. Aso und T. Sekine[3]) wiesen Nitrate makrochemisch in Knospen von Sagittaria sagittifolia, sowie in den etiolierten Stengeln von Erbsenkeimlingen und Kartoffeltrieben nach und halten ihre Befunde gegenüber Einwänden von R. Klein aufrecht.

Nitrite finden sich nach R. Klein[4]) im Preßsaft von Erythrina-Blättern und in den Wurzelknöllchen einiger Leguminosen, besonders reichlich bei denen von Phaseolus multiflorus.

Bemerkenswert ist noch das Vorkommen von salpetriger Säure in einigen Bakterien (Cholerabazillus).

In Schnitten ist Nitrit noch nicht nachgewiesen worden. Zum Nachweis in den Preßsäften können folgende Reaktionen dienen:

1. Mit der Lösung von m-Phenylendiamin in 1proz. Salzsäure entsteht eine gelbe Färbung.

2. Der mit wässeriger Sulfanilsäure und einigen Tropfen Schwefelsäure versetzten Flüssigkeit wird wässerige α-Naphthylaminlösung hinzugefügt: Bei starker Verdünnung deutliche Rosafärbung, bei starker Konzentration starke Rotfärbung, die unter Bildung eines Niederschlags in Gelb übergeht (Grieß).

3. Der mit wässeriger Sulfanilsäure und 2—3 Tropfen Salzsäure versetzten Flüssigkeit wird weingeistige Diphenylaminlösung hinzugefügt. Rotfärbung. Wenn als Überschichtungsreaktion ausgeführt, rote Zone (R. Klein).

4. Mit weingeistiger α-Naphthylaminlösung und ein wenig verdünnter Salzsäure tiefdunkle Violettfärbung oder Niederschlag.

---

[1]) R. S. Tjaden Moddermann, Chem. Centralbl., 1888, I, S. 377. — Giustiniani, Chem. Centralbl., 1896, I, S. 930.

[2]) J. Weehuizen, Über salpetrige Säure in Erythrina, Pharm. Weekbl., 1907, XLIV, S. 1229.

[3]) R. Aso und T. Sekine, Beihefte z. bot. Centralbl., 1915, XXXII, Abt. I, S. 146.

[4]) R. Klein, l. c. S. 137.

Fehlerquellen sind bei den Reaktionen, die in saurer Lösung zu Rotfärbungen führen, die Anthocyane, ferner nachträgliche Entstehung von Nitrit durch bakterielle Reduktion von Nitraten.

Ein sehr empfindliches Reagens auf Nitrite hat Dané[1]) angegeben. Das Reagens besteht aus einer Lösung von 0,02 g synthetischem Indol in 150 ccm 95proz. Weingeist. Bei Anwesenheit von Nitriten tritt bei Zusatz des Reagens und 50proz. Schwefelsäure eine rosarote bis rote Färbung auf. Die Reaktion ist noch bei einer Verdünnung von 1 : 2,5 Mill. zu erkennen und eignet sich zum Nachweis von Nitrit in Schwefelsäure und anderen Reagentien. In der Pflanzenasche beweist die Gegenwart von Nitrit wohl meistens, daß in der Pflanze Nitrate vorhanden waren, die durch die Kohle reduziert worden sind.

Hydroxylamin

Hydroxylamin entsteht, wie durch Blom[2]) entdeckt wurde, als Zwischenprodukt bei der Reduktion von Nitraten durch Mikroorganismen. Der Nachweis erfolgte im allgemeinen so, daß das durch Zusatz von Azeton zu den Kulturen entstandene Azetoxim abdestilliert, dieses mit Säuren hydrolysiert und das freigewordene Hydroxylamin durch empfindliche Reaktionen nachgewiesen wurde. Über die Empfindlichkeit (Grenzkonzentration) der Reaktionen gibt folgende von Blom[3]) herrührende Tabelle Auskunft.

Empfindlichkeit der Reaktionen auf Hydroxylamin.

	Verfasser	Reagens	Empfindlichkeit in g NH_2OH im Liter	Bemerkungen
1	Angeli . . .	Natriumnitroprussid	0,1	Nichtspezifisch
2	Bamberger	Benzoylchlorid + $FeCl_3$	0,005	NH_3 stört
3	Kostytschew	Diacetylmonoxim + Ni	0,002	
4	Ball	$(NH_4)_2S + NH_4OH +$ Alkohol	0,002	
4	Fischer . . .	$(NH_4)_2S + NH_4OH + MnS$	0,00047	
5	Blom	$p_6Br\text{-}C_6H_4\text{-}NO + \alpha\text{-}C_{10}H_7OH$	0,0001	
6	Blom	Grieß Reagens	0,000003	

Es genügt hier, nähere Angaben über die beiden letzten Nachweisverfahren zu machen.

Nachweis von Hydroxylamin mit p-Bromnitrosobenzol und α-Naphthol. Nötig: 1. Eine Lösung von 0,37 g p-Br C_6H_4-NO in einem Liter 96proz. Weingeist. 2. Eine mit 5 Tropfen Salzsäure ver-

---

[1]) Dané, Einfaches Verfahren zum Nachweis der Nitrite, Bull. soc. chim. France, 1911 [4], IX, S. 354.

[2]) J. Blom, Bildung von Hydroxylamin bei der Reduktion von Nitraten durch Mikroorganismen, Biochem. Zeitschr., 1928, CXCIV, S. 393.

[3]) Derselbe, Zum Nachweis von Hydroxylamin, ebenda S. 385.

setzte Lösung von 0,29 g α-Naphthol in einem Liter Wasser. 3. Eine $n/_2$-Natronlauge (20 g NaOH im Liter). 4. Eine verdünnte Lösung eines Magnesiumsalzes.

20 ccm Lösung werden neutralisiert, dann mit 2 ccm $n/_2$-Natronlauge geschüttelt und darauf mit 2 ccm einer frischen Mischung von 3 Raumteilen 1. und 2 Raumteilen 2. versetzt. Bei Anwesenheit geringer Mengen von Hydroxylamin färbt sich die Lösung orangerot (bei dessen Fehlen nur schwachgelb). Auf Zusatz von 1 bis 2 Tropfen Magnesiumsalz-Lösung schlägt die Farbe in ein grelleres Rot um, schließlich bildet sich ein grellroter Bodensatz (bei Abwesenheit von Hydroxylamin ein gelber).

Nachweis von Hydroxylamin mit Grießschem Reagens. Nötig: 1. Sulfanilsäurelösung. 10,5 g Sulfanilsäure ($m/_{20}$) 6,8 g Natriumazetat ($m/_{20}$), 300 g Eisessig (etwa 5 mol.) werden mit 600 ccm Wasser zum Sieden erhitzt und das Kochen 3 Minuten unterhalten. Nach Abkühlung wird auf 1000 ccm verdünnt. 2. α-Naphthylaminlösung. Etwas mehr als ein 1 Liter Wasser wird zum Sieden erhitzt, darauf mit 5 g α-Naphthylamin versetzt und noch 5 Minuten gekocht. Nach Filtrieren durch ein großes Filter werden zu dem noch heißen Filtrat 5 ccm Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) gesetzt. Nach Abkühlen wird auf 1 Liter aufgefüllt. 3. Eine Lösung von 1,3 g Jod in 100 ccm Eisessig (etwa $n/_{10}$). 4. Eine Lösung von 2,5 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5\,H_2O$ in 100 ccm Wasser (etwas $n/_{10}$).

Man erhitzt 100 ccm Flüssigkeit mit 100 ccm 1. in einem Kolben 5 Minuten zum schwachen Sieden, gibt nach Abkühlung auf Zimmertemperatur 1 ccm 3. hinzu (Oxydation des Hydroxylamins zu salpetriger Säure und nach 5 Minuten 1 ccm 4. (zur Entfernung des Jods). Versetzt man dann mit 5 ccm 2., so tritt bei Anwesenheit von Hydroxylamin Rotfärbung ein.

Phosphor

Phosphor tritt in den Pflanzen teils in anorganischer (Phosphate), teils in organischer (Eiweißverbindungen, Nukleoproteide, s. d.) Bindung auf. Phosphate können in der Pflanze auch bei der Zersetzung organischer Phosphorverbindungen entstehen. Überwiegend stammen sie aus dem Boden. Die Phosphate des Bodens sind für die Pflanzen unentbehrlich; sie nehmen an dem Aufbau der plasmatischen Gebilde (Zellkern, Stroma) in hervorragendem Maße teil. Den Wurzeln stehen im Boden leicht und schwer lösliche Phosphate zur Verfügung. Im Holz erreicht der Phosphorsäuregehalt im Mai zur Zeit der größten Wachstumstätigkeit sein Maximum; im allgemeinen enthält die Holzasche 3—6 %. Abnorm hohe Werte zeigt die Asche von Tectona grandis L. (29 %) und von Quercus (22 %). Die Asche der Rinden führt nur geringe Mengen Phosphor (Ausnahmen: Birkenrinde 12 %, Chinarinde bis 18 % Phosphorsäureanhydrid u. a.). In den Blättern lassen

sich im Mesophyll und in den Palisaden nur geringe Mengen Phosphate nachweisen. Große Quantitäten finden sich im Leitparenchym der Blattnerven. Wahrscheinlich ist im Blatte die Phosphorsäure in organischer Bindung zugegen. Die Blattasche hat einen Gehalt von 10—15 %, zuweilen bis zu 30 % an Phosphorsäureanhydrid. Zum Herbst erfolgt eine Rückwanderung der Blattphosphorsäure in den Stamm, doch kommt es nicht zu einer Entleerung der Blätter. Am größten ist der Gehalt in den Samen, in denen er 40—50 % der Reinasche beträgt. Die Samenschalen sind arm an Phosphorsäure. Im Samen ist die Art der Speicherung der Nährstoffe (Aleuron, Fett, Stärke) nicht von Einfluß auf den Gesamtgehalt an Phosphor. Die Phosphorsäure ist dort fast nur in organischer Bindung zugegen, in Wurzeln und Rhizomen hingegen vorzugsweise als Phosphat. Die Leitung der Phosphate findet in dem chlorophyllarmen Mark- und Rindenparenchym der Wurzel und Stengel, sowie im Nervenparenchym der Blätter statt. In den Siebröhren werden organische Phosphorverbindungen geleitet.

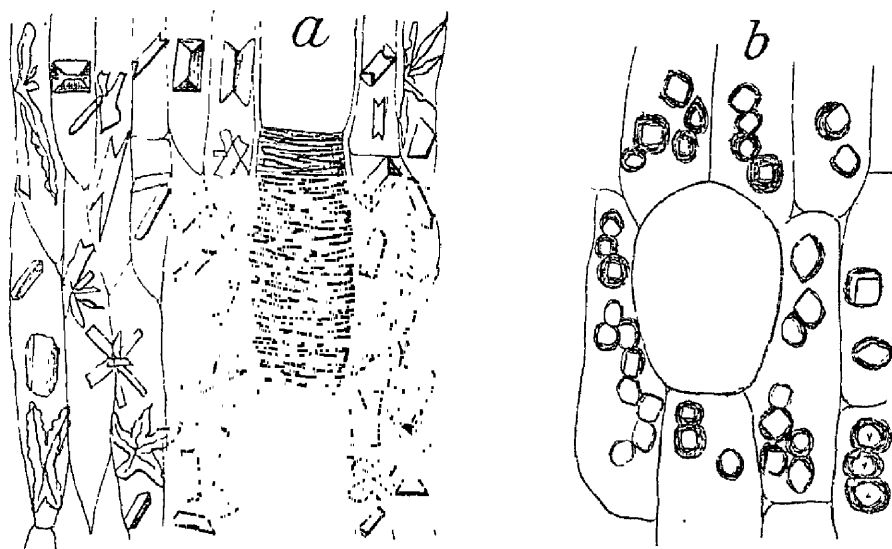



Fig. 33. Phosphornachweis; *a*) Cochlearia armoracia (Wurzel, Längsschnitt) mit Ammoniak; *b*) Althaea officinalis (Wurzel, Längsschnitt) mit Ammoniummolybdat (Tunmann)

Zum mikroskopischen Nachweis des Phosphors in Phosphaten benutzte Hansen[1]) eine salpetersaure Lösung von Ammoniummolybdat, die in der Chemie und in der Mineralogie schon lange zu gleichem Zwecke gebraucht wurde. Benutzt wird eine Lösung von 1,0 g molybdänsaurem Ammon in 12,0 ccm Salpetersäure (spez. Gew. 1,18). Es entsteht eine gelbliche Fällung von Ammoniumphosphormolybdat, die zuweilen kleinkörnig ausfällt, meist aber reguläre Kristalle, (5—10 μ groß, Kombinationen von Würfel und Oktaeder) bildet (Fig. 33b). Die Fällung löst sich in Ammoniak. Bei Beginn ihrer Ausbildung sehen die Kristalle wie kleine gelbe Fetttröpfchen mit schwarzem

[1]) A. Hansen, Über Sphärokristalle, Arb. aus dem bot. Institut Würzburg, 1885, III, S. 95.

Rand aus, dann wie Sphärokristalle mit zentralem Kern; eine kristallinische Struktur ist im gewöhnlichen Lichte erst nach einer Stunde wahrnehmbar. Die Reaktion, die oft erst nach einigen Stunden eintritt, kann durch die Gegenwart einiger organischer Verbindungen (weinsaure Salze) verhindert werden. Auch in Lösung befindliche Kieselsäure wird mitgefällt. Diese ist bei manchen Objekten nicht ausgeschlossen (Equiseten, Bambusen). Bei Präparaten, die stark verkieselte Membranen besitzen, verfährt man, um ganz sicher zu sein, in folgender Weise: Einige Präparate werden auf dem Objektträger mit einigen Tropfen Wasser ausgezogen, die Präparate werden beiseite geschoben, die Lösung wird bei mäßiger Temperatur eingedampft. Hierbei wird eventuell anwesende Kieselsäure in der Regel unlöslich[1]). Der Rückstand wird dann mit molybdänsaurem Ammon behandelt. — Außerdem sind Arsenverbindungen, die bei dieser Methode ebenfalls in Reaktion treten, theoretisch, aber wohl kaum praktisch zu berücksichtigen. Mit Ammoniummolybdat-Salpetersäure wird organisch gebundene Phosphorsäure (Nukleoproteide, s. d.) vornehmlich nach längerer Zeit oder bei gelindem Erwärmen, ebenfalls Reaktionen geben, um diese jedoch mit Sicherheit nachweisen zu können, müssen die Präparate verascht werden. Die Asche liefert sofort einen Niederschlag, der die Gesamtphosphorsäure anzeigt. — Zur Ermittelung der Lokalisation kann die Reaktion oft nicht dienen[2]), da das Ammoniumphosphormolybdat vorwiegend außerhalb der Zellen entsteht. Anderseits hat die Reaktion bei amylumreichen Schnitten den Vorteil, daß die Säure des Reagens die Stärke löst und die Fällungen besser sichtbar werden. Auch ist zu beachten, daß bei Ermittelung von Phosphaten die gleich-

Fig. 34. Phosphornachweis mi[illegible], Equisetum arvense [illegible] (Tunmann)

[1]) Es besteht immerhin die Möglichkeit, daß so ein Teil der Kieselsäure löslich bleibt.

[2]) Vgl. dazu auch Wöhler und Engels, Kolloidchem. Beihefte, 1910, I, S. 474.

zeitig erfolgende Alkaloid- und Eiweißfällung störend wirken kann, vorzüglich bei Samen.

Sehr empfindlich ist ferner der Nachweis mit Magnesiummixtur von Pfeffer[1]). Diese Reaktion wird durch organische Substanzen nicht verhindert (Schimper)[2]). Man benutzt gesättigte wässerige Lösungen von Magnesiumsulfat und von Chlorammonium. Zum Gebrauch mischt man 25 Volumen Magnesiumsulfatlösung mit 2 Volumen Chlorammoniumlösung und 15 Volumen Wasser (*Zimmermann*). Es bilden sich recht charakteristische Kristalle von Ammonium-Magnesium-Phosphat. Die Kristalle gehören dem rhombischen System an und besitzen ein verschiedenes Aussehen. Man trifft sargdeckelartige Formen, kreuzförmig angeordnete Prismen, 4—8strahlige Sterne, deren Strahlen in kleine Täfelchen auslaufen, sowie X- und H-artige Kristallskelette (Fig. 34). Nebeneinander treten meist verschiedene Kristallformen auf[3]). Die Kristalle sind unlöslich in Ammoniak, lösen sich aber leicht und schnell in Säuren, selbst in Essigsäure. Trägt man die Schnitte direkt in die Magnesiamischung ein, so erhält man die Kristalle zum großen Teile innerhalb der Zellen. Neuere Erfahrungen zeigen, daß die zur Bildung von Ammonium-Magnesium-Phosphat nötige Menge Magnesium, wenn auch nicht immer, so doch oft, neben den Phosphaten in den Geweben enthalten sind. In derartigen Fällen genügt zur Kristallbildung schon ein Zusatz von Ammoniak (Fig. 33a). Da anwesendes Kalium die analoge Verbindung in gleicher Kristallform bilden kann, so bleibt es in solchen Fällen zunächst fraglich, ob die Kalium- oder Magnesiumverbindung des phosphorsauren Ammoniums vorliegt[4]). Zum Nachweis von Eiweiß-Phosphorsäure müssen die Präparate vorher verascht werden. So veraschte Pfeffer die Globoide der Aleuronkörner und fügte der Asche ammoniakalische Chlorammoniumlösung zu, worauf sich aus dem amorphen Magnesiumphosphat der Asche langsam Kristalle von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia ausschieden.

Die beiden im vorstehenden besprochenen Methoden sind derzeit die besten Reaktionen auf Phosphorverbindungen. Es ist zweckmäßig, beide Reaktionen auszuführen, da sie sich ergänzen. Bleibt mit dem

[1]) W. Pfeffer, Untersuchungen über die Proteinkörner und die Bedeutung des Asparagins beim Keimen d. Samen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1872, VIII, S. 429.

[2]) A. F. W. Schimper, Flora, 1890, LXXIII, S. 216.

[3]) Die bei der Reaktion entstehenden Kristalle stimmen in jeder Hinsicht mit dem Mineral Struvit überein, wie O. Richter zeigte (Ein Beitrag zur Kenntnis des Magnesium-Ammonium-Phosphates Mg $(NH_4) PO_4 . 6 H_2O$, Tschermaks Min. u. Petrogr. Mitt., 1901, XX, S. 89.

[4]) Zur Entscheidung dient das Verhalten gegen verdünntes Ammoniak. in dem die Kalium-Verbindung weit löslicher ist, als die Magnesium-Verbindung,

Magnesiumgemisch eine Reaktion aus, tritt aber mit Ammoniummolybdat nach einiger Zeit oder bei gelindem Erwärmen ein (wenn auch geringer) Niederschlag auf, so deutet dies auf eine organische Phosphorverbindung hin, die durch die Salpetersäure des Reagens zersetzt wurde (vgl. unten). Legumin und Casein geben nach einigen Minuten selbst ohne Erwärmung den charakteristischen gelben Niederschlag von Ammoniumphosphormolybdat, nicht aber Lezithin- und Glyzerin-Phosphorsäure. Erhält man mit dem Magnesiumgemisch runde oder elliptische Körner, so ist nach Iwanoff[1]) ein Hinweis darauf gegeben, daß die organische Phosphorverbindung als Eiweißverbindung vorliegt. Casein und Vitellin geben nämlich ähnliche kuglige Niederschläge[2]); Glyzerinphosphorsäure gibt mit dem Magnesiumgemisch einen kleinkörnigen Niederschlag, Lezithin reagiert aber nicht, auch nicht echtes Globulin (Conglutin).

Lilienfeld und Monti[3]) haben Untersuchungen ausgeführt, die neben dem Phosphor in Phosphaten auch den in organischer Bindung nachweisen sollten. Die Untersuchungen wurden mit tierischen Geweben ausgeführt und beruhen darauf, daß beim Eintragen eines phosphorhaltigen Gewebes in eine Salpetersäurelösung von Ammoniummolybdat die Molybdänsäure in den phosphorhaltigen Zellen niedergeschlagen wird. Da der Niederschlag nicht gut sichtbar ist, so wird die Molybdänsäure durch geeignete Mittel reduziert. Ungeeignet zur Reduktion erwiesen sich Zinnchlorür, Alkaloide, Ferrichlorid; Gerbsäure ließ sich eher verwenden. Die besten Resultate gab Pyrogallol. Freie Phosphorsäure soll sofort gefällt werden, die gebundene erst bei längerem Behandeln der Schnitte mit molybdänsaurem Ammoniak. Letztere läßt sich jedoch durch Barytwasser oder Natriumkarbonat sofort in Freiheit setzen. Die Präparate kommen somit auf ½ bis mehrere Stunden in molybdänsaures Ammoniak, werden dann gründlich mit Wasser ausgewaschen und gelangen schließlich auf einige Minuten in eine 20proz. wässerige Pyrogallollösung. Durch die Pyrogallollösung nehmen die phosphorhaltigen Zellen und Zellbestandteile je nach ihrem Phosphorgehalt eine gelbe, braune bis schwarze Färbung an. Werden die Präparate in Alkohol entwässert, dann hält sich die Färbung einige Zeit in Kanadabalsam.

[1]) L. Iwanoff, Das Auftreten und Schwinden der Phosphorverbindungen in den Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1901, XXXVI, S. 355.

[2]) Moraczewski, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1898, XXV, S. 252.

[3]) L. Lilienfeld und A. Monti, Über die mikrochemische Lokalisation des Phosphors in den Geweben, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1892 XVII, S. 410.

Trotzdem dieses Verfahren auf botanischem Gebiete einer scharfen Kritik begegnete, wurde es von Pollacci[1]) warm empfohlen, der zur Reduktion Zinnchlorür benutzt, welches nach den Erfahrungen von Lilienfeld und Monti sich nicht bewährte. Die Molybdänsäure-Zinnchlorür-Reaktion wird in folgender Weise ausgeführt. Die Präparate (von lebendem oder von in Alkohol eingelegtem Material) werden mit Hilfe einer mit Platinspitzen versehenen Pinzette (oder mit Platindraht, Glasstäbchen) in eine Lösung von molybdänsaurem Ammoniak gebracht, deren Temperatur 40° nicht übersteigen soll, dann wiederholt gründlich mit durch wenig Salpetersäure angesäuertem Wasser ausgewaschen und schließlich in eine 4proz. wässerige Lösung von Zinnchlorür übertragen. Je weniger Phosphor zugegen ist, um so konzentrierter muß die Zinnchlorürlösung gewählt werden. Phosphor zeigt sich durch eine dunkelblaue bis blaugrüne Färbung im Gewebe an (Bildung von Molybdänsesquioxyd). Die Präparate sind in Glyzerin, Wasser, Kanadabalsam und verdünnnter Salpetersäure haltbar. Das Molybdänsäure-Reagens hat folgende Zusammensetzung[2]): a) Lösung von 15 g kristallinischem molybdänsaurem Ammonium in 100 ccm ammoniakalischem Wasser; b) 70 Teile Salpetersäure (spez. Gew. 1,18) und 30 Teile Wasser. Gleiche Teile von a) und b) werden gemischt, der beim Mischen entstehende Niederschlag löst sich beim Schütteln. Pollacci[3]) hat seine Reaktion wiederholt verteidigen müssen[4]).

[1]) G. Pollacci, Über die Verteilung des Phosphors in den pflanzlichen Geweben, Malpighia 1894, VIII, Sep.

[2]) G. Pollacci, Über die Methoden zum mikrochemischen Nachweis des Phosphors in pflanzlichen Geweben, Atti dell' Ist. Bot. dell' Univ. di Pavia, 1900, 2 Ser. VI, S. 15 und 1904, X, S. 16.

[3]) G. Pollacci, Über die mikrochemische Prüfung auf Phosphor vermittels des Molybdänreagens und Zinnchlorürs in tanninhaltigen Zellen, Malpighia 1895, IX, S. 370. — Andere Resultate als Pollacci erhielten Arcangeli (Sulla ricerc. microch. del Fosforo nei tessuti vegetabili, Att. d. Soc. Toscana, Pisa, 1902, XVIII) und nach E. Zacharias (Progr. rei bot., 1909, III, S. 127) auch Bertolo.

[4]) Eine Verschärfung der Molybdat-Reaktion läßt sich auch dadurch erzielen, daß man den Niederschlag erst mit einer mit Essigsäure versetzten Lösung von Benzidinchlorhydrat und dann mit Ammoniak behandelt (Feigl, Zeitschr. f. analyt. Chem., 1922, LXI, S. 454). Eine Verwertung der Reaktion in der pflanzlichen Mikrochemie hat bisher nicht stattgefunden. Dasselbe gilt für den Nachweis der Phosphorsäure mit dem Molybdat-Strychnin-Reagens, das mit Phosphorsäure eine Fällung von phosphor-molybdänsaurem Strychnin gibt.

Darstellung des Reagens. Eine filtrierte Lösung von 40,0 Ammonmolybdat in 100 ccm Wasser versetzt man unter kräftigem Umschütteln nach und nach mit soviel (etwa 80 ccm) einer einprozentigen Lösung von Strychnin-, bis eine schwache Trübung bestehen bleibt. Diese Lösung gießt man

Die Kritik setzte mit einer Arbeit von Raciborski[1]) ein. Unvollständiges Auswaschen des molybdänsauren Ammoniums soll die Reaktion verursachen; die Salpetersäure bilde außerdem Xanthoprotein und dieses gibt mit Zinnchlorür eine ähnliche Reaktion; in gerbstoffhaltigen Zellen sei die Reaktion ebenfalls unbrauchbar. Auch Fiori hat in Gerbstoffzellen Schwarzfärbung beobachtet. Diese soll jedoch nach Pollacci in Säuren, also auch in der stets etwas sauren Zinnchlorürlösung langsam verschwinden, worauf bei Gegenwart von Phosphor die Blaufärbung hervortritt. Heine[2]) hat aber gezeigt, daß das von ihm hergestellte Histon, dessen Asche keine Phosphorreaktion gab, stärker nach Lilienfeld und Monti reagierte als eine phosphorreiche Nukleinsäure.

Géneau de Lamarlière[3]) verfolgt die Phosphate in den Zellmembranen durch Erwärmen der Präparate mit einer Lösung von Ammoniummolybdat in Salpetersäure. Die Reaktion (Gelbfärbung) ist verschieden von der durch die Salpetersäure des Reagens bewirkten Reaktion. Letztere tritt auch in der Kälte ein und verblaßt beim Erwärmen. Doch bleibt es dahingestellt, inwieweit sich Silikate an der Reaktion beteiligen, die in vielen Fällen mit der Verholzungsreaktion zusammenfällt. Die Molybdänreaktion tritt noch ein, wenn man die Phoroglucinreaktion durch Behandeln der Präparate mit Eau de Javelle unmöglich gemacht hat. Lamarlière bringt ferner die mit Molybdänsalpetersäure behandelten Präparate in schwache Zinnchlorürlösung und erzielt Blaufärbung der Zellwände. Hierbei bläuen sich nun auch Membranen, die mit Molybdänsalpetersäure allein keine Reaktion geben. Die vorliegende Beobachtung bedarf somit einer weiteren Prüfung; sie stützt nicht die Angaben über die Lokalisation des organisch gebundenen Phosphors.

In Cyanophyceen und in Hefezellen weist Macallum[4]) organische Phosphorverbindungen nach, indem er das durch Alkohol gehärtete

unter Umschütteln zu einem gleichgroßen Volumen (180 ccm) Salpetersäure (spez. Gew. 1,4). Man läßt über Nacht stehen und gießt klar ab.

[1]) M. Raciborski, Kritisches Referat über die Arbeit von Lilienfeld und A. Monti, Über die mikrochemische Lokalisation des Phosphors in den Geweben, Bot. Ztg., 1893, LI, 2. Abt., S. 245.

[2]) L. Heine, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1896, XXII, S. 132.

[3]) L. Géneau de Lamarlière, Quelques observations sur le molybdate d'ammonium employé comme réactif des membranes cellulaires, Bull. soc. bot. de France, 1902, XLIX, S. 183.

[4]) A. B. Macallum, On the cytology of non-nucleated organisms, Transact. Canadian. Inst., 1899, VI, S. 439 und: On the detection and localization of Phosphor, Proc. Roy. Soc., 1898, LXIII, S. 474.

Material erst in Wasser, dann bei 35° auf ¼—48 Stunden in salpetersaures Molybdänammon bringt, mit verdünnter Salzsäure kurz auswäscht und schließlich in eine 1 proz. Lösung von salzsaurem Phenylhydrazin überträgt. Phosphorhaltige Zellbestandteile sollen blaugrün werden.

Mac Callum[1]) hatte vorgeschlagen, zur Erkennung der anorganischen neben den organischen Verbindungen das Freseniussche Reagens[2]) einmal nur wenige Minuten, weiter bis zu 24 Stunden einwirken zu lassen und als Reduktionsmittel für den Molybdat-Niederschlag Phenylhydrazinhydrochlorid (s. oben) zu verwenden. Eine Modifikation dieser Methode nach Weyland[3]) wird folgendermaßen ausgeführt:

Im Alkohol gehärtetes Material wird geschnitten; die Schnitte werden einige Minuten bis 24 Stunden in Freseniussche Lösung gebracht. Sie werden darauf mit wenig Salpetersäure enthaltendem Wasser gründlich gewaschen und in eine 3 proz. wässerige Phenylhydrazinhydrochloridlösung auf 10—15 Minuten übertragen. Nach erneutem Waschen in Wasser werden sie auf dem Objektträger in wenige Tropfen 1 proz. wässeriger Hämatoxylinlösung gelegt, wo sie unter ständiger Beobachtung ½—1—2 Minuten bleiben, um dann sofort wiederholt in reinem Wasser ausgewaschen zu werden. An den phosphorhaltigen Stellen ist dann eine rein blaue bis blaugrüne Färbung eingetreten.

Salomon versuchte, nach Entfernung der anorganischen Phosphate als Ammonium-Magnesium-Phosphat den organisch gebundenen Phosphor durch längere Einwirkung des Molybdat-Reagens nachzuweisen.

Die allen vorhergehenden Verfahren zugrunde liegende Annahme, daß der organisch gebundene Phosphor durch längere Behandlung mit Salpetersäure freigemacht wird, ist nach G. Klein nicht stichhaltig. Er hat deswegen in Anlehnung an ein Verfahren von Mandel und Neuberg ein eigenes Verfahren ausgearbeitet[4]).

Die Schnitte werden in kochendem Wasser kurz abgebrüht oder durch zweistündiges Verweilen in 96 proz. Weingeist fixiert, dann

[1]) A. B. Mac Callum, Die Methode und Ergebnisse der Mikrochemie in der biologischen Forschung, Ergebnisse d. Physiologie, 1908, VII, S. 632.

[2]) 1 Teil Molybdänanhydrid wird mit 4 Teilen Ammoniak (spez. Gew. 0,88) unter häufigem Umschütteln 24 Stunden beiseite gestellt; zum Filtrat fügt man 15 Teile Salpetersäure (spez. Gew. 1,2).

[3]) H. Weyland, Zur Ernährungsphysiologie mykotropher Pflanzen, Jahrbücher f. wiss. Bot., 1912, LI, S. 1.

[4]) G. Klein, Mikrochemischer Nachweis und Wandel des organisch gebundenen Phosphors in der Pflanze, Planta 1926, II, S. 497.

48 Stunden mit destilliertem Wasser unter öfterer Erneuerung des Wassers ausgewaschen. Bei Vorhandensein schwerlöslicher Phosphate Vorbehandlung mit Salpetersäure von der Konzentration des Molybdänreagens.

Die Schnitte, die nach genügendem Auswaschen frei von Phosphat sind, kommen dann auf zwei Stunden in eine etwa 5proz. Lösung von Ferronitrat, die mit einigen Tropfen rauchender Salpetersäure versetzt wird und werden hernach eine Minute — nicht länger — in einem Schälchen mit Perhydrol (30 volumenproz. H_2O_2) geschwenkt. Darauf bringt man die Schnitte auf einen flach hohlgeschliffenen Objektträger und bedeckt sie mit einem Tropfen Perhydrol. Wenn (nach 1—2 Stunden) das Gewebe zu mazerieren beginnt, dann setzt man — zur Zerstörung des Wasserstoffperoxyds — eine Spur Zinkstaub zu, läßt den Flüssigkeitstropfen eindunsten und versetzt zuletzt mit dem Molybdänreagens.

Hält man Schnitte der weißen Rübe 12 Stunden bei 32° in $n/_{100}$ KCl im hohlen Objektträger, läßt nach Entfernung der Schnitte eintrocknen oder fällt mit Bleiazetat, so gibt der direkte Trockenrückstand oder der angetrocknete Bleiniederschlag eine Fällung mit dem Molybdatreagens erst nach obiger Behandlung (Nachweis des Phosphors in Phosphatiden), wenn die Schnitte phosphatfrei waren. Analoge Behandlung mit $n/_{100}$ Ca-Lösung zieht nur etwa vorhandenen anorganischen Phosphor aus.

Phosphate treten in den lebenden Zellen fast nur in gelöster Form auf. In den frischen Blättern von Robinia pseudacacia und von Soja hispida hatte Nobbe[1]) Kalziumphosphat angegeben, eine Angabe, die aber von Kohl[2]) widerlegt wurde. Nachprüfungen ergaben für die erste Pflanze nur die Anwesenheit von Kalkoxalat. Zimmermann[3]) gibt für die lebenden Zellen der Stengel und Blätter einer Cyperusart Kalziumphosphat-Ausscheidungen an. Es sind runde Gebilde, die einen aus oxalsaurem Kalk bestehenden Kern besitzen, um den das Kalkphosphat schalenartig angelagert ist. Sie sind von einer Hülle umgeben, die bei langsamer Lösung der Grundmasse zurückbleibt. Die Globoide enthalten stets Phosphat (Kalk-Magnesium) in fester Form (s. Aleuronkörner). Phosphate scheiden sich aber, weniger beim Trocknen der Pflanzen, weit mehr und besser beim Einlegen frischer Pflanzen

[1]) Nobbe, Hänlein, Councler, Vorläufige Notiz betr. das Vorkommen von phosphorsaurem Kalk in der lebenden Pflanzenzelle, Landw. Versuchsstat., 1879, XXIII, S. 471.

[2]) F. G. Kohl, Kalksalze, S. 156.

[3]) A. Zimmermann, Über Kalziumphosphatausscheidungen in lebenden Zellen, Beitr. z. Morph. u. Physiolog. d. Pflanzenzelle, 1893, H. III, S. 311.

in Weingeist nach einiger Zeit aus. Die Ausscheidungen in Glyzerin sind meist von etwas abweichender Form. Unter diesen Ausscheidungen, die die Gestalt von Sphäriten besitzen, wiegt der phosphorsaure Kalk vor.

Die sog. **Kalziumphosphatsphärite** (Fig. 35) lösen sich unter Deckglas nur langsam in Wasser, Ammoniak und in Essigsäure, leicht in Mineralsäuren, ohne Gasentwicklung, in Schwefelsäure unter sofortiger Bildung von Gipsnadeln. Im polarisierten Lichte erscheinen sie wie Inulinsphärite oder Stärkekörner. In Glyzerin sind die durch Weingeist gefällten Sphärite unlöslich, sie halten sich daher in Glyzeringelatine. Diese Sphärite bestehen aber keineswegs nur aus phosphorsaurem Kalk. Schon Leitgeb[1]) wies darauf hin, daß sie keine chemisch einheitliche Substanz darstellen. Viele Sphärite, vornehmlich die deutlich kristallinischen, besitzen einen amorphen Kern, der aus einer organischen Substanz noch unbekannter Natur besteht. Beim Glühen läßt sich an geeigneten Objekten (Dahlien, Asclepiadaceen, kaktusartige Euphorbiaceen, Mesembryanthemum-Arten) Verkohlung der Kernsubstanz beobachten. Der Kern löst sich nicht in Wasser, selbst nicht in heißem, ist auch unlöslich in Weingeist und in Äther. Er nimmt Farbstofflösungen (Boraxkarmin, Methylenblau) an, ohne die Farben zu halten. Denn beim Auswaschen verschwindet die Färbung wieder. Sphärite, die weder Schichtung noch Kern zeigen, lassen sich vollständig mit Karmin tingieren. Hier scheint die organische Substanz durch die ganze Masse der Sphärite verteilt zu sein. Nun vermögen größere Quantitäten von Glykose Kalziumphosphat zu lösen und so festzuhalten, daß sich selbst nach stundenlangem Einleiten von Kohlensäure der Kalk nicht ausscheidet. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß die Sphärite aus phosphorsaurem Kalk und einem Kohlenhydrat bestehen. Auch ist an das Vorkommen weiterer Doppelverbindungen der Phosphorsäure zu denken. Hansen[2]) meinte, daß die Kalziumphosphate in der lebenden Pflanze an Eiweißsubstanzen gebunden seien. So

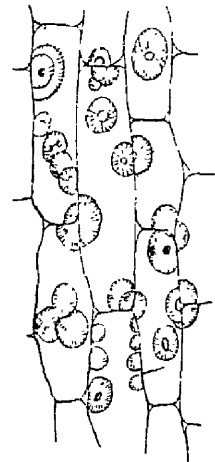



Fig. 35. Helianthus annuus (peripheres Markparenchym), in Alkohol zur Abscheidung gelangte, Kalziumphosphat enthaltende Sphärite (Tunmann).

[1]) H. Leitgeb, Über die durch Alkohol in Dahliaknollen hervorgerufenen Ausscheidungen, Bot. Ztg., 1887, XLV, S. 129 und: Über Sphärite, Mitt. d. bot. Inst. Graz, 1888, I, 2. Heft, S. 257.

[2]) A. Hansen, Über die Bedeutung der durch Alkohol in Zellen bewirkten Kalziumphosphatausscheidungen, Flora, 1889, LXXII, S. 408.

gibt Re[1]) in Agave americana Sphärite an, die aus Kalk, Phosphorsäure und einer noch unbekannten organischen Substanz bestehen. Letztere zeigt sich durch Bräunung der Sphärite bei Einwirkung von verdünnter Silbernitratlösung an. Die Sphärite der kaktusartigen Euphorbien (E. coerulescens, E. resinifera u. a.) sollen nach Belzung[2]) ein mit Apfelsäure gepaartes Phosphat sein. Diese Sphärite sind zunächst amorph, nehmen erst später ihre radiäre Struktur an, lösen sich in Wasser und stimmen in ihrem Verhalten mit künstlichem apfelphosphorsaurem Kalk überein. — Bei den oben (S. 148) erwähnten Cyperus-Sphäriten löst sich der phosphorsaure Kalk selbst in heißem Wasser und 5proz. Essigsäure nur sehr langsam. Eisessig übt keine Wirkung aus, erst bei nachfolgendem Wasserzusatz erfolgt Lösung. Durch Salzsäure wird der Kalziumoxalatkern gelöst, die Phosphathülle bleibt ungelöst zurück. In 10proz. Kalilauge findet keine Veränderung statt. Ammoniak färbt die Sphärite gelb. Im polarisierten Lichte erscheint die Grundsubstanz isotrop, der Kern stark aufleuchtend. Auch die Sphärite, die man in Helianthus annuus (Rinden- und Markparenchym) antrifft, müssen eine komplizierte Zusammensetzung haben. Sie lösen sich nicht in heißem Wasser und beim Kochen in Chloralhydrat. Die von Heinricher[3]) in Lathraea-Arten (Weingeistmaterial) studierten Phosphatkugeln zeigen keine Struktur und lösen sich nicht in Wasser, Chlorzinkjod, 3proz. Kalilauge und innerhalb vier Stunden in Eau de Javelle. In letzterem Reagens lösen sie sich nach 20 Stunden; in kochendem Wasser sind sie schwer und nicht völlig löslich. Hingegen sind sie schnell und leicht löslich in 1proz. Essigsäure, 1proz. Chromsäure, Pikrinsäure, verdünnten Mineralsäuren. In konzentrierter Essigsäure lösen sich die Phosphatkugeln nur schwer. Ein Gehalt an Magnesium oder Kalzium ließ sich in ihnen nicht nachweisen. Ein eigenartiges, an die Sphärite von Euphorbium erinnerndes Verhalten zeigen nach Tunmann[4]) die durch Weingeist bewirkten Fällungen in Equisetum arvense. Lebende Schnitte, auf dem Objektträger mit Weingeist behandelt, zeigen in den Assimilationszellen kleine Sphärokristalle; in Weingeistmaterial sind die Ausscheidungen auf Gruppen von Zellen beschränkt. Sie sind schwer löslich in warmem

[1]) L. Re, Über das Vorkommen von Sphäriten bei Agave americana, Annuar. Real. Istit. botan. di Roma, 1894, V, S. 38.

[2]) E. Belzung, Nature des sphérocristaux des Euphorbes cactiformes, Journ. de Bot., 1893, VII, S. 221.

[3]) E. Heinricher, Anatomischer Bau und Leistung der Saugorgane der Schuppenwurz-Arten, Cohns Beitr. z. Biol. d. Pfl., 1895, VII, Sep.

[4]) O. Tunmann, Bemerkungen über einige Kryptogamen-Drogen, Schweiz. Wchschr. f. Chem. u. Pharmaz., 1910, XLVIII, Nr. 43.

Wasser und Chloralhydrat. Erst bei längerem Erwärmen lösen sich größere Anteile und zurück bleibt eine ölige Masse; Essigsäure und verdünnte Schwefelsäure lösen sehr schwer, konzentrierte Schwefelsäure läßt braune Tropfen austreten unter Bildung von Gipsnadeln. Ammoniummolybdat und Magnesiumgemisch geben positive Resultate. Die Kristalle bestehen aus Phosphorsäure, gebunden an Kalzium und an einen noch unbekannten Körper, wahrscheinlich organischer Natur. Rodier[1]) beschreibt Sphärite im Weingeistmaterial von Senecio vulgaris und cineraria (Rinden- und Markparenchym). Sie gleichen den von Hansen in Euphorbia caput medusae angegebenen, haben eine radiär kristallinische Rinde und eine amorphe Zentralmasse. Letztere und die Hüllhaut sollen organischer Natur sein. Phosphor ist im Gewebe nur in geringer Menge nachweisbar. Die Kristalle sind löslich in kaltem Wasser, Essigsäure, Salzsäure, Salpetersäure ohne Gasentwicklung und geben mit verdünnter Schwefelsäure Gipsnadeln. Die Natur dieser Sphärite scheint doch noch fraglich zu sein. Ungemein reich an Kalziumphosphat fand Vogl[2]) die unterirdischen Teile von Dentaria enneaphylla L. (Cruciferen, Radix Saniculi), in denen sich in der primären Rinde Sphärite bis zu 300 μ Durchmesser ausscheiden. Die großen Sphärite sind nun häufig mit einer dicken amorphen oder fein radial gestreiften Schale umgeben, die, „wenn nicht allein, so doch hauptsächlich Eiweißstoffe" enthält, während nur der kristallinische Kern aus Kalziumphosphat besteht. Die Kristalle in Holz und Rinde des Teakholzes (Tectona grandis L.) wurden von Wiesner[3]) für Kalziumphosphat gehalten. Die Asche des Holzes enthält 29% Phosphorsäure (Thoms)[4]). Nach Kohl[5]) bestehen die Kristalle aus Kalkoxalat, da sie sich in verdünnter und in konzentrierter Essigsäure nicht lösen.

Kobaltnitrat (1:100) kann als Hilfsreaktion beim Nachweis von Kalziumphosphat dienen. Kalziumphosphatzellen (zuweilen auch die Inhalte der Siebröhren) geben mit verdünnter wässeriger Kobaltnitratlösung beim Aufkochen einen blauen Niederschlag. Doch muß die Gegenwart der Phosphate mit weiteren Reagentien festgestellt und die beim Einlegen in Weingeist entstehende Ausscheidung studiert werden.

[1]) E. Rodier, Sur la formation et la nature des sphérocristaux, Compt. rend., 1889, CVIII, S. 906.

[2]) A. v. Vogl, Üb. Rad. Saniculi d. Apoth., Öst. Apoth.-Ztg., 1904, XLVIII, Nr. 21.

[3]) J. Wiesner, Über die Ablagerung von kohlensaurem Kalk im Stamme dikotyler Holzgewächse, Sitzgsber. Wiener Akadem., 1881, II, S. 7.

[4]) G. Thoms, Landwirtsch. Versuchsstat., 1879, XXIII, S. 413.

[5]) F. G. Kohl, Kalksalze, S. 156.

Weit seltener sind bisher Ausscheidungen von **phosphorsaurer Magnesia** gefunden worden. Drusen und Sphärokristalle von Magnesiumphosphat traf Hansen[1]) in frisch in Weingeist eingelegten Stengelstücken von Saccharum officinarum an. Die Kristalle lösen sich schwer in kaltem Wasser und in Essigsäure, besser in heißem Wasser, leicht in Salzsäure (ohne Gasentwicklung), Salpetersäure und Schwefelsäure (ohne Bildung von Gipskristallen). Magnesium wurde mit ammoniakalischer Lösung von Chlorammon und Natriumphosphat, Phosphorsäure mit molybdänsaurem Ammon nachgewiesen. Ähnliche Bildungen hat Zacharias[2]) in den Siebröhren von Cucurbita pepo angetroffen.

In Hefe und einigen Bakterien kommt Pyrophosphat vor[3]). Über einen mikrochemischen Nachweis ist nichts bekannt.

Arsen

Arsen wurde von Gautier 1910 als normaler Bestandteil von Meeresalgen gefunden. Spätere Untersuchungen haben dann gezeigt, daß Spuren von Arsen ein regelmäßiger Pflanzenbestandteil sind. Pflanzenmikrochemische Untersuchungen liegen nicht vor. Sie sind auch bei den geringen in Betracht kommenden Arsenmengen aussichtslos. v. Fellenberg[4]) fand im Spinat 17 γ, in Zwiebeln 11,6 γ, in Kartoffeln 3,4 γ, Birnen 14,2 γ pro 100 g Trockensubstanz. Arsenreicher sind Pflanzen, die auf arsenreichem Boden gewachsen sind und Meeresorganismen. In der eßbaren japanischen Alge Kombu fand v. Fellenberg 2010 γ, in Nori 3010 γ pro 100 g Trockensubstanz.

Bor

Bor ist in Spuren in Pflanzen vielfach gefunden worden, besonders im Obst, Vitis (Kalifornien), dann in Hedera helix, Humulus lupulus u. a. In der Asche von Früchten kommt es bis zu 0,5 % vor. In nicht zu geringen Mengen wirkt es fördernd auf das Wachstum (katalytische Düngemittel Bertrands). Große Mengen wirken giftig.

Aber es scheint, daß kleine Mengen von Bor zur Entwicklung einer Anzahl höherer Pflanzen nötig sind[5]).

Schädigungen der Wurzel bei Abwesenheit von Bor s. A. L. Sommer u. Sorokin, Plant Physiology 1928, III, S. 237.

[1]) A. Hansen, l. c., S. 115.

[2]) E. Zacharias, Bot. Ztg., 1884, XLII, S. 65.

[3]) Fr. Lohmann, Die Menge der leicht hydrolysierbaren P-Verbindung in tierischen und pflanzlichen Zellen. Biochem. Zeitschr., 1928, CCIII, S. 164.

[4]) Th. v. Fellenberg, Über den Arsengehalt natürlicher und mit Arsenpräparaten behandelter Lebensmittel, Mitteilungen a. d. Gebiet der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 1929, XX, S. 338.

[5]) Johnston, Chem. Centralbl., 1929, I, S. 1226; A. L. Sommer und C. B. Lipman, Bot. Centralbl., 1927, XI, S. 331.

Der Nachweis im Gewebe ist noch nicht versucht worden. Da geeignetes Material nicht überall zur Verfügung steht, wird man sich die Versuchspflanzen bei borathaltiger Düngung kultivieren müssen. Der Nachweis wird bei nicht zu geringen Mengen vielleicht mittels der Kurkumareaktion gelingen, wenigstens geht dieses aus dem Kurkuminnachweis (s. d.) hervor. Die Schnitte müßten in Kurkumatinktur eingetragen werden, dann wird die Flüssigkeit verjagt. In den trockenen Präparaten werden die borsäurehaltigen Zellen eine rotbraune Färbung annehmen, die Färbung wird bei Zusatz von Natronlauge vorübergehend blau werden.

Bei Auszügen wird man in gleicher Weise verfahren oder die Empfindlichkeit durch Anwendung von Kurkumaleinenfaser steigern (Empfindlichkeitsgrenze 0,0005 μg, Emich)[1]. Die filtrierte Abkochung von 5 g Kurkumapulver in 10 g Weingeist wird zur Trockne gebracht und der Rückstand in einigen Kubikzentimetern 50proz. Weingeist unter Zusatz von wenig Soda gelöst. Mit der Lösung wird gebleichte Leinenfaser (oder Baumwolle, nicht Schafwolle oder Seide) aufgekocht. Nach der Färbung wird die Faser herausgenommen, abgepreßt, in stark verdünnter Schwefelsäure abgespült, in Wasser ausgewaschen und getrocknet vorrätig gehalten. Den mit Salzsäure angesäuerten Probetropfen läßt man nun auf dem Objektträger an einem Ende der Kurkumafaser eintrocknen; hat sich das Ende braun gefärbt, dann bewirkt Zusatz von 13 proz. Sodalösung vorübergehend Blaufärbung.

Kohlenstoff

Kohle

Zum Nachweis der Kohle bedient man sich des von Wiesner[2] erprobten Chromsäure-Gemisches, welches, wie Zimmermann[3] mitteilt, von Crüger in die botanische Mikrotechnik eingeführt wurde. Eine konzentrierte wässerige Lösung von Kaliumdichromat wird mit überschüssiger Schwefelsäure versetzt; dann wird soviel Wasser zugefügt, als erforderlich ist, um die sich ausscheidende Chromsäure in Lösung zu halten. Das Reagens gestattet eine Ermittlung des Grades der Verkohlung. Amorpher Kohlenstoff ist, selbst in seinen kleinsten Teilchen, völlig undurchsichtig und wird erst, ebenso wie Ruß, nach längerer Zeit von dem Chromsäuregemisch angegriffen und gelöst. Hingegen wird Braunkohle, die in kleinsten Teilchen braun gefärbt und durchscheinend erscheint, nach kurzer Zeit bis auf einen farblosen Rückstand gelöst. Dieser Rückstand läßt zuweilen die Zellstruktur

---

[1] J. Donau, Lieb. Ann., 1907, CCCLI, S. 426.

[2] J. Wiesner, Über den mikroskopischen Nachweis der Kohle in ihren verschiedenen Formen und über die Übereinstimmung der Lungenpigmente mit der Rußkohle, Sitzgsber. Wien. Akad., 1892, CI, 1. Abt., S. 379.

[3] A. Zimmermann, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1892, IX, S. 264.

deutlich erkennen und gibt Zellulosereaktion. Anthrazit besteht aus braungefärbten, durchscheinenden Körnchen, die sich im Chromsäuregemisch ohne Zelluloserückstand lösen, und aus schwarzen Teilchen, die mit der Braunkohle übereinstimmen. In der Steinkohle finden sich amorpher Kohlenstoff, Braunkohlepartikelchen und verkohlte Harze. Die Holzkohle läßt sich unterscheiden als Rotkohle (mit der Braunkohle übereinstimmend) und als Schwarzkohle (wie Rußkohle sich nur sehr schwer im Chromsäuregemisch lösend, aber noch Zellstrukturen zeigend). Graphit enthält kleine schwarze Körnchen, die selbst nach 2 Monaten im Chromsäuregemisch unverändert bleiben. — Auch starke Bleichmittel werden sich zur Diagnose eignen. Lignit wird durch Kaliumchlorat-Salzsäure bis zur blaßgelben Farbe aufgehellt (T. F. Hanausek, Kohleschicht, Sitzgsber. Wien. Akad., 1907, CXVI, S. 11), Kohle aber nicht (Ed. Praël, Schutz- und Kernholz, Diss. Rostock, 1888, S. 71).

Zur Untersuchung kohlig erhaltener Pflanzenreste wendet Gothan[1]) Mazeration mit Schulzeschen Reagens ($KClO_3 + HNO_3$) und nachfolgende Behandlung mit Ammoniak an.

Bei Pflanzenresten jüngerer Perioden genügt es in manchen Fällen mit Javellescher Lauge zu bleichen; meist muß man jedoch Schulzesche Mazerationsflüssigkeit anwenden. Wasserstoffperoxyd leistet da gute Dienste, wo das die inkohlten Pflanzenreste umgebende Gestein von Säuren zu stark angegriffen wird und deshalb beim Zerfallen die zu präparierenden Pflanzenteilchen zerreißt (Potonié 1915).

Hoffmeisters Gemisch (Kaliumchlorat und Salzsäure) läßt sich wegen seiner milden Wirkung besonders bei Ligniten oft vorteilhafter anwenden als das Schulzesche. Zur Färbung der fossilen cuticulae und der kutinisierten Membranen eignet sich Gentianaviolett[2]).

Bei der Untersuchung von bituminösen Kohlen, Braunkohlen und Ligniten, wandte Jasui[3]) folgende Verfahren an:

1. Jeffreys Methode. Die zugeschnittenen 1 cm großen Stücke werden in Baumwollsäckchen eine Woche bei 65° in geschmolzenem

[1]) W. Gothan, Über die Methoden und neue Erfolge bei der Untersuchung kohlig erhaltener Pflanzenreste, Sitzgsber. Gesellsch. naturforsch. Freunde, Berlin 1915, S. 43.

[2]) R. Potonié, Mitteilungen über mazerierte kohlige Pflanzenfossilien, Zeitschr. f. Bot., 1921, XIII, S. 79; P. Kraft, Eine neue Methode zur Entfärbung des rezenten und fossilen Chitins, sowie fossiler Zellulose, Naturwissenschaften, XIV, S. 85.

[3]) K. Jasui, Studies on the structure of lignite, brown coal and bituminous coal in Japan, Journ. of the faculty of science Univ. Tokyo, sect. 3, Botany, 1928, I, part 4, S. 381; Referat in Zeitschr. wiss. Mikroskopie, 1929, XLVI, S. 430.

Phenol gehalten. Nach Auswaschen mit fließendem Wasser kommen sie 2 Wochen in Fluorwasserstoffsäure. Diese Behandlung wird so oft als nötig wiederholt. Weiterbehandlung: Allmähliche Überführung in absoluten Alkohol, 2proz. Zelloidin (65⁰), 6proz. Zelloidin (Zimmertemperatur, 10—15 Atm. Druck, 12 Stunden je 24 Stunden in 8- und 16proz. Zelloidin; Härten in Chloroform, Glyzerin-Weingeist 1 : 1. Die 2—5 μ dicken Schnitte werden unmittelbar in Balsam eingeschlossen.

2. Behandlung mit Fluorwasserstoffsäure eine Woche oder länger, gut auswaschen mit fließendem Wasser, einige Tage in Glyzerin-Weingeist (1 : 1). Weiterbehandlung wie bei 1.

Über den Nachweis von Zellulose in Torf, Braunkohle und Steinkohle s. R. Potonié und W. Benade, Braunkohle 1929, XXVIII, S. 435.

Kohlensäure und Karbonate

Unter den Karbonatausscheidungen steht weitaus der kohlensaure Kalk an erster Stelle[1]). Nur in geringerer Menge finden sich andere kohlensaure Alkalisalze. Die Kalküberzüge der Potamogetonarten führen relativ große Anteile an kohlensaurer Magnesia. Die Trichome der Bohnen und Malvaceen scheiden kohlensaures Kali aus. Die meisten Hydathoden (Haberlandt) scheiden kohlensauren Kalk an die Oberfläche aus. Bei den Gesneraceen ist der subkutikulare Raum der Drüsen mit kohlensaurem Kalk erfüllt, ohne daß es zu einer Ausscheidung nach außen kommt (Solereder). Das ausgeschiedene Karbonat bildet kleine Schüppchen, überzieht auch zuweilen krustenartig die ganze Oberfläche (Wüstenpflanzen). An vielen submersen Pflanzen zeigt die Oberfläche einen Karbonatüberzug, der aber überwiegend aus dem Wasser stammt. Es sei ferner an die Kalkalgen erinnert, bei denen der Kalk nicht nur der Membran aufgelagert, sondern ihr auch eingelagert ist. Kalkeinlagerungen der Membran kommen vorzugsweise bei Trichomen vor und werden oft von Kieselsäure begleitet (Cruciferen, Saxifragaceen, Boragineen, Compositen, Loaseen, Umbelliferen, Urticaceen u. a.). Mehr oder weniger umgebildete Trichome, die Karbonate führen, sind auch die Cystolithen (gestielt) und die cystolithenähnlichen Gebilde (ungestielt), die im Innern der Gewebe (hauptsächlich in Epidermiszellen, nicht im Holze) und in Trichomzellen (Haarcystolithen) auftreten (Urticaceen, Acanthaceen, Cucurbitaceen u. a.), s. S. 189.

Zum Teil sind die Ausscheidungen amorph, bei Hanburia mexicana finden sich rhomboedrische Kristalle von Kalziumkarbonat abgelagert in den gemeinsamen Wänden einzelner Zellgruppen der Epidermis. Kristalle finden sich ferner zwischen den Rindenzellen einzelner Charen, auf den Hyphen von Pilzen, in den Blatthöhlen

[1]) Vgl. auch: Kohl, Kalksalze und Kieselsäure, S. 98; Haberlandt, Physiolog. Pflanzenanatomie, S. 430; Solereder, Systemat. Anatomie, S. 934 u. a. Ausscheidungen von Kalziumkarbonat können entstehen, wenn pflanzliche Objekte mit karbonathaltigen Laugen oder anderen alkalischen Flüssigkeiten (Javellesche Lauge) behandelt werden (C. Griebel, Zeitschr. f. Untersuchg. Nahrgs. u. Genußm., 1922, XLIII, S. 172.

von Lathraea squamaria. Auch das Karbonat der Cystolithen ist doppelt lichtbrechend, also kristallinischer Natur. Im Zellinhalte ist kohlensaurer Kalk angetroffen worden in Form kleiner Körnchen bei Myxomyceten, Schwefelbakterien[1]), Purpurbakterien und Mucorineen, in Cotyledonen von Urtica dioica, in Perikarpien von Piper, Cubeba, Lithospermum, Celtis, Cerinthe, in den Peridermzellen der Rinde von Capparis verrucosa Jacq., sowie im Kernholz (Gefäße, Tracheiden, Thyllen) einiger Dikotylen (Ulmus, Sorbus, Pirus, Fagus, Salix, Betula u. a.). Betreffs des Vorkommens im Kernholz sei daran erinnert, daß Glykose große Mengen Kalziumkarbonat in Lösung zu halten vermag. Beim Übergang der Elemente ins Kernholz wird der Gehalt an Glykose abnehmen, so daß es zur Karbonatausscheidung kommt. — In physiologischer Hinsicht sollen die Inkrustationen einen Schutz gegen Tierfraß bedingen (Stahl), bei den Kalkalgen nach Kohl, der die Cystolithen als Kalkspeicher anspricht, mechanisch und festigend wirken. Auch die Kalkfüllungen des Kernholzes dürften festigend wirken. Durch Kalkausscheidungen, die Kohl mit der Atmung in Zusammenhang bringt, wird ein Transpirationsschutz erzielt (Volkens).

Über die Auffassung des Kalziumkarbonats der Pflanze als Defäkationsprodukt s. A. Frey-Wyssling, Vergleich zwischen der Ausscheidung von Kieselsäure und Kalziumsalzen in der Pflanze. Ber. deutsch. bos. Ges. 1930, XLVIII. S. 184.

Von Interesse ist, daß Aspergillus mutatus Kalziumglukonat in Kalziumkarbonat umwandelt, daß aber aus Natriumglukonat Natriumoxalat entsteht (C. Wehmer, Ber. deutsch. chem. Ges. 1929, LXII, S. 2672).

Zum Nachweis der Kohlensäure in den Ausscheidungen von Kalziumkarbonat benutzt man vorteilhaft nur konzentrierte Salzsäure. (Die hier und da empfohlene Essigsäure löst, verdünnt angewandt, zu langsam.) Man lege das Präparat in einen kleinen Tropfen Wasser, so daß nur das Präparat selbst vom Wasser bedeckt ist, und füge während der Beobachtung konzentrierte Salzsäure zu, deren Einwirkung durch seitliches Heben des Deckglases beschleunigt wird. Derart lassen sich selbst geringe Quantitäten Kohlensäure an der „Blasenbildung" nachweisen. Liegt das Präparat in viel Wasser und erfolgt die Lösung infolge Anwendung einer schwachen Salzsäure oder einer konzentrierten Essigsäure langsam, so kommt es vor, daß die allmählich frei werdende Kohlensäure von der Untersuchungsflüssigkeit

[1]) In den Vakuolen der Schwefelbakterien Achromatium oxaliferum, Mikrospira vacillans und Pseudomonas hyalina (bei letzterer ohne die Gegenwart von Schwefel) liegen größere (2 bis 12 μ) Körner von amorphem kohlensauren Kalk, umschlossen von einem dünnen Häutchen. (E. Bersa, Über das Vorkommen von kohlensaurem Kalk in einer Gruppe von Schwefelbakterien. Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss. Math. nat. Kl., Abt. I, 1920, CXXIX, S. 231.)

absorbiert wird und sich der Sichtbarmachung entzieht (Melnikoff)[1]. — Durch Glühen wird das Kalziumkarbonat in Kalziumoxyd übergeführt, verliert also die Kohlensäure, die Präparate geben mit Salzsäure keine Blasenbildung mehr. (Über Cystolithen s. Kalzium.)

E. Bersa, Über das Vorkommen von kohlensaurem Kalk in einer Gruppe von Schwefelbakterien. (Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss. Math. nat. Kl., Abt. I, 1920, CXXIX, S. 231.)

Bersa hat mit dem amorphen Kalziumkarbonat der Schwefelbakterien folgende Reaktionen erhalten:

Mit Barytwasser geben die Körner unter langsamer Auflösung einen kleinkörnigen, farblosen Niederschlag oder Sphärite.

Konzentriertes Bleiazetat, Silbernitrat oder Zinksulfat geben weiße Niederschläge.

Mit konzentriertem Sublimat entsteht ein gelb bis -dunkelroter Niederschlag.

Mit Kupfersulfat und H_2O_2 färben sich die Inhaltskörper bald gelblich und nehmen schließlich eine rot- bis dunkelbraune Farbe an; in Ferrosulfatlösung nehmen sie eine braungrüne Farbe an, die zuerst in eine braungelbe und nach etwa 15 Minuten in eine goldgelbe übergeht.

Schwefelkohlenstoff

Über Schwefelkohlenstoff liegen nur wenige Erfahrungen vor. Jedenfalls ist er in Gasform ein giftiger Körper, und Bokorny zeigte, daß Holzpflanzen durch einen Gehalt des Bodens an Schwefelkohlenstoff geschädigt werden. Bekannt ist ferner, daß im käuflichen Senföle kleinere Mengen Schwefelkohlenstoff (A. W. Hofmann) vorkommen, die durch Einwirkung von Wasser auf Senföl entstanden.

Schwefelkohlenstoffausscheidungen in Gestalt stark lichtbrechender Tröpfchen fand Went[2]) an den Seitenzweigen des Mycels von Schizophyllum lobatum Bref., einem Pilze, der auf Java allgemein auf toten Zweigen (Bambusen, Zuckerrohr) verbreitet ist und einen intensiven Geruch entwickelt. Der Pilz wurde auf Zuckerpeptonagar gezüchtet, die Kulturflüssigkeit destilliert, das Destillat in weingeistiger Kalilauge aufgefangen. Der Schwefelkohlenstoffgehalt wurde durch Neutralisation mit Essigsäure und Zusatz von Kupfersulfatlösung nachgewiesen (gelber Niederschlag von xanthogensaurem Kupfer). Eine mikrochemische Bearbeitung der Ausscheidungen fehlt noch. Der Schwefelkohlenstoff wird wahrscheinlich von kleinen Drüsen (Knötchen) ausgeschieden.

Silicium

Kieselsäure kommt vorzugsweise in den Zellwänden vor. Verkieselte Membranen zeichnen sich durch Härte und Festigkeit aus, gewähren den Pflanzen

[1]) P. Melnikoff, Untersuchungen über das Vorkommen des kohlensauren Kalkes in Pflanzen, Dissertation Bonn, 1877.

[2]) F. A. Went, Schwefelkohlenstoffbildung durch Schizophyllum lobatum, Ber. deutsch. bot. Ges., 1896, XIV, S. 158.

einen Schutz[1]) und sind nach v. Mohl[2]) noch wachstumsfähig; daher nimmt die Kieselsäure während der Entwicklung dauernd zu. Schon Sachs zeigte (an Wasserkulturen von Zea u. a.), daß sie zum Leben nicht unbedingt nötig ist. Oft tritt sie gemeinsam mit Kalziumsalzen auf, oft vertritt sie diese. Bekannt sind die Kieselpanzer der Diatomeen (Kieselgur), von denen Fragaria elliptica sogar kolloidales SiO_2 lösen kann: viele Pilze (Secale cornutum), Gefäßkryptogamen (Equisetum-Arten) und Monokotylen (Gramineen, die Asche von Saccharum officinarum besteht fast nur aus Kieselsäure, Cyperaceen, Palmen) führen Membrankieselsäure, ebenso zahlreiche Familien der Dikotylen[3]) (Urticaceen, Aristolochiaceen, Euphorbiaceen, Compositen, Cucurbitaceen, Chrysobalaneen, Burseraceen u. a.). — In der Asche von Holz und Rinde sind überwiegend nur wenige Prozent Kieselsäure, in der Cautorinde aber 98 %, im Holz der Coniferen meist 10, der Cedrela-Arten oft 30—50 %. — Ein Kieselsäurekonkrement ist das im Stengel tropischer Bambusen auftretende Tabaschir. Der Kieselsäuregehalt der Pflanzen ist stark abhängig von dem Kieselsäuregehalt des Bodens. „Bei mangelnder Zufuhr enthalten die gleichen Pflanzen oft erstaunlich kleine Mengen von Kieselsäure. — Von bedeutendem Einfluß ist aber auch das Alter der Pflanzen. Vollentwickelt sind sie durchwegs reicher an Kieselsäure" (Gaudard). Ein Teil der Kieselsäure kann in löslicher Form vorhanden sein. So enthält das trockene Kraut von Equisetum arvense nach Gaudard[4]) mindestens 0,5 % lösliche Kieselsäure und zwar in Form einfacher Säuren etwa bis zur Stufe der Hexasäure, da sie durch Eiweiß nicht gefällt wird.

Reinigt man die Membran von Equisetum arvense durch Schwefelsäure $+ H_2O_2$, dann mit Ammoniak, verdünnter Salzsäure, Wasser, Weingeist und Äther, dann bleibt ein die Struktur der Epidermis zeigender Rückstand, der 97 bis 98 % SiO_2 ergibt.

Reich an Kieselsäure sind die kutikularisierten Membranen der Epidermen und Trichome (Kutikularwärzchen, Haarknoten); teils ist die gesamte Außenmembran verkieselt, teils nur bei bestimmten Zellgruppen (Grenzzellen der Trichome). Stark verkieselt sind verbildete Spalten, auch der Ausführungskanal des Entleerungsapparates der Myrtaceen[5]). Seltener sind Korkzellen verkieselt (Liquidambar, Croton eluteria)[6]).

Stark verkieselt ist nach Guttmann[7]) die Epidermis vieler Boragineenfrüchte.

[1]) E. Stahl, Pflanzen und Schnecken, Jena 1888, S. 72.

[2]) H. v. Mohl, Über das Kieselskelett lebender Pflanzenzellen, Bot. Ztg., 1862, XX, S. 230.

[3]) Vollständiges Verzeichnis der Dikotylen bei H. Solereder, Syst. Anat. d. Dikotyled., Ergzbd., 1908, S. 353.

[4]) F. Gaudard, Über den Kieselsäuregehalt einiger Arzneipflanzen, Pharmaceutia acta Helvetiae, 1929, IV, S. 157.

[5]) O. Tunmann, Entleerungsapparat der Myrtaceendrüsen, Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 25.

[6]) Hockauf, Pharm. Post, 1897, XXX, Nr. 51.

[7]) A. Guttmann, Die Kieselmembranen der Boragineenfrüchte, Zeitschr. allg. österr. Apoth. Ver., 1917, LV, S. 219.

Über Kieselsäure in Algen s. Fr. Hustedt, Die Kieselalgen Deutschlands, Österreichs und der Schweiz in Rabenhorsts Kryptogamenflora, Leipzig, 1928 und H. Bethge, Über die Kieselalge Sceletonema subsalsum (A. Cleve), Bethge, Ber. deutsch. botan. Gesellsch., 1928, XLVI, S. 340.

Nach Lehbert[1]) bestehen viele Haare (Cruciferen, Myosotis, Verbascum Thapsus, Urtica dioica und urens) in der Hauptsache aus Kieselsäure; die Zellulose tritt bis auf einen dünnen, das mineralische Skelett bedeckenden Überzug zurück. Silizium ist also in diesen Fällen Baustoff.

Die ersten gegen Salzsäure widerstandsfähigen Skelette erhält man erst nach vollständig erreichter Blattgröße.

Die Ablagerung von Kieselsalzen beginnt am Blattrand und an den Blattspitzen, bei Vorhandensein von Kieselhaaren betrifft sie die Epidermiszellen um den Haarfuß.

Wasserpflanzen besitzen keine, Sumpf-, Strand- und Alpenpflanzen, nur selten Kieselmembranen.

Über die Verbreitung s. Netolitzky[2]); ferner:

F. Netolitzky, Die Kieselkörper urd Kalksalze als Zellinhaltskörper in Linsbauers Handbuch der Pflanzenanatomie III/1a (1929) u. A. Frey — Wyssling, Über die Ausscheidung der Kieselsäure in der Pflanze, Ber. deutsch. bos. Ges. 1930, XLVIII, S. 179.

Die Ausbildung der Verkieselung in den Kieselzellen der Gramineen verläuft nach Frohnmeyer[3]) folgendermaßen:

An die ursprüngliche aus Pektinsubstanzen bestehende Wand lagert sich eine Zelluloselamelle an. In dieser Lamelle beginnt die Verkieselung. Man sieht in diesem Stadium an Oberflächenschnitten bei nicht zu breiter Lamelle einen lichtbrechenden Kieselring. Von diesem Ring aus setzt sich die Verkieselung ins Lumen fort und drängt das Plasma allmählich in der Mitte zusammen, so daß es entweder ganz verschwindet oder nur noch in einigen Bläschen vorhanden ist.

Bei Korkkurzzellen und Langzellen fehlt die Zelluloselamelle.

Die Feststellung der Stärke der Verkieselung kann dazu benutzt werden, reife von unreifen Mohnfrüchten zu unterscheiden. Nach Guttmann[4]) ist bei unreifen Früchten die Epidermis nur ganz leicht verkieselt und nicht an allen

[1]) R. Lehbert, Haargebilde der Blätter phanerogamischer Gewächse und der Anteil, den die Kieselsäure hierbei hat. Beilage d. Zeitschr. „Pharmacia", Reval 1923.

[2]) F. Netolitzky, Kieselmembranen der Dicotyledonenblätter Mitteleuropas, Österr. bot. Zeitschr. 1912, LXII, S. 353.

[3]) M. Frohnmeyer, Die Entstehung und Ausbildung der Kieselzellen bei den Gramineen, Bibl. bot., 1914, LXXXVI.

[4]) A. Guttmann, Zur Beurteilung von Fructus papaveris, Pharmazeut. Post, 1914, XLVII, S. 1.

Stellen. Bei reifen Früchten sind außer der Epidermis Teile tieferliegender Schichten und einzelne Gefäßbündel stark verkieselt. Im Aschenpräparat (mit kleiner Flamme erhitzen, vor der Betrachtung Zusatz eines Tropfens sehr verdünnter Salzsäure) sieht man bei unreifen Früchten nur vereinzelte zarte einschichtige Kieselskelette, bei den reifen massenhaft große mehrschichtige stark verkieselte Zellgruppen mit den Gefäßbündeln.

Bei der Diagnose leisten die Kieselmembranen in sehr vielen Fällen vorzügliche Dienste, so sind die Trichome der Digitalisverfälschungen (Inula-Arten, Symphytum officinale) verkieselt, Digitalistrichome nicht verkieselt[1]). Mit Hilfe kieselhaltiger Aschenskelette konnte Cyperus esculentus im Darminhalte 6000 Jahre alter ägyptischer Mumien nachgewiesen werden[2]).

Weit weniger oft finden sich Kieselsäureausscheidungen im Zellinnern. Diese können entweder frei im Zellumen liegen oder sind, der häufigere Fall, der Zellwand an einer Stelle angeheftet (Cyperus alternifolius). Kohl betrachtet diese „Kieselkörper" als Konkremente von fast reiner Kieselsäure, da sie keine Zellulosereaktion geben, und führt die Bräunung beim Glühen auf anhaftende Substanzen zurück. Doch finden sich zuweilen bei den Aristolochiaceen große Kieselkörper, deren zentrale, ungeschichtete Masse nicht verkieselt ist, aber auch keine Zellulosereaktion gibt[3]). Zudem ist es nicht ausgeschlossen, daß die Kieselsäure als organische Verbindung (ähnlich wie der Kohlenstoff) auftritt, wodurch sich die Bräunung beim Glühen erklären würde. Es ist auch möglich, daß Zellulose übersehen wurde Nach Kohl soll bei Kieselkörpern zuerst das Plasma verkieseln. Ausfüllung von Gefäßen und anderen Elementen des Kernholzes ist zuerst wohl von Crüger[4]) bei der Stammpflanze der Cautorinde, der westindischen Chrysobalanee Moquilea, beobachtet worden, kommt auch bei einigen Verbenaceen vor. Im Rindenparenchym von Moquilea greift der geschichtete, doppelbrechende, opalisierende Kieselkörper selbst in die feinsten Tüpfelkanäle und in die Interzellularen hinein. Mohl (l. c.) fand ähnliche Bildungen nahe den Gefäßen in den Blättern von Magnolia glauca, Licania crassifolia, Davilla brasiliana, Hirtella racemosa Lam., Mirbelia nilagirica Zenk.

Kieselkörper finden sich ferner im Holzparenchym und in den Markstrahlen von Petrea volubilis; bei Petrea arborea sind auch Gefäße und Thyllen verkieselt (Crüger, l. c.). Sie kommen vor in den Blättern von Chrysobalanus icaco, Hirtella punctata Miq., Davilla radula Mart. (Mohl, l. c.), in Hymenophyllaceen (Mettenius)[5]), in Palmen und Moraceen (Phoenix dactylifera, Caryota urens, Rosanoff[6]), Treub)[7]), in den Blättern der Podostemaceen (Epidermis, subepidermale

[1]) C. Hartwich u. Bohny, Apoth.-Ztg., 1906, XXI, S. 277.

[2]) Fr. Netolitzky, Arch. f. Chem. u. Mikr., 1911, IV, Heft 5.

[3]) Tunmann, Micania Guaco (Rhizoma Aristolochiae), Gehes Ber., 1910.

[4]) Crüger, Westind. Fragmente, Bot. Ztg., 1857, XV, S. 299.

[5]) Mettenius, Abhandl. d. Kgl. sächs. Ges. d. Wissensch., 1864, VII[2], S. 419.

[6]) Rosanoff, Über Kieselsäureablagerung in einigen Pflanzen, Bot. Ztg., 1871, XXIX, S. 749.

[7]) M. Treub, Observations sur le Sclérenchym, Amsterdam 1877.

Zellen, Trichome, Cario[1]) und in den langgestreckten Zellen nahe der Gefäße, Warming)[2]). Außerdem untersuchten Kieselkörper Licopoli[3]) bei Chamaerops humilis L. und anderen Palmen, Pfitzer[4]) bei Orchideen, Kohl bei Palmen, Orchideen, Scitamineen, Grob[5]) bei Gramineen, Solereder[6]) bei Aristolochiaceen, wo sie ein wichtiges diagnostisches Merkmal bilden. Viel untersucht bis in die neueste Zeit (H. Pfeiffer[7])) wurden die von Duval-Jouve entdeckten Kegelzellen der Cyperaceen, deren Kegel verkieselt sind.

Bei den Duval-Jouveschen Körperchen steht es nach G. Borissow nicht fest, ob sie Cystolithen sind, d. h. ob sie durch eine Zellwandschicht vom Zellumen abgegrenzt sind.

Pfeiffer stellte für die Duval-Jouveschen Körper folgendes fest:

Die Duval-Jouveschen Körper grenzen gewöhnlich direkt an das Zellumen.

Die Kegelzellen der Cyperaceen sind den Kieselkurzzellen der Gramineen homolog.

Die Ablagerung der SiO_2-Gallerten erfolgt als eine Dehydratation in die Zellen eindringender Sole.

(H. Pfeiffer, Über die Erscheinungen bei der Verkieselung von Pflanzenzellen, insbesondere derer der Cyperaceen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1929, XLVII, S. 78).

Besonders große Kieselkörper fand Molisch[8]) in der Epidermis des Blattes von Arundo donax und in den Prismenzellen des Endokarps der Steinnuß; auch in der Epidermis des Zuckerrohrs, in Bambusa und Zea mais kommen Kieselkörper vor (Wieler[9])).

Es sei noch der Kieselkörper im Holzparenchym der Dipterocarpeen, Malvaceen, Sterculiaceen, Tiliaceen, Burseraceen, Anacardiaceen, Sapotaceen gedacht, die von Bargagli-Petrucci[10]) beschrieben wurden. Kieselkörper sollen auch im Milchsafte von Antiaris toxicaria vorkommen (Gorodetzky[11])).

[1]) Cario, Anatom. Unters. von Tristicha hypnoides Spreng., Bot. Ztg., 1881, XXXIX, S. 28.

[2]) E. Warming, Kiselsyre dannelser hos Podostemaceae, Kjobenhavn 1881.

[3]) Licopoli, Ricerch. e microchim. s. Chamaerops humilis L., Att. d. R. Ac. d. Science fis. e mat. di Napoli, 1881, XI.

[4]) R. Pfitzer, Flora, 1877, LX, S. 245.

[5]) Grob, Beitr. z. Anat. d. Epiderm. d. Gramineenblatt., Zürcher Dissert. 1896.

[6]) H. Solereder, Vgl. Anatom. d. d. Aristolochiaceen, Englers Jahrb., 1889, X, S. 410.

[7]) H. Pfeiffer, Der heutige Stand unserer Kenntnisse von den Kegelzellen der Cyperaceen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1921, XXXIX, S. 353.

[8]) H. Molisch, Über Riesenkieselkörper im Blatte von Arundo donax, Ber. deutsch. bot. Ges., 1918, XXXVI, S. 474.

[9]) A. Wieler, Beiträge zur Anatomie des Stockes von Saccharum, Beitr. z. wissensch. Bot., 1898, II, S. 145.

[10]) Bargagli-Petrucci, Malpighia, 1902.

[11]) Serg. Gorodetzky, Antiaris toxicaria in pharmakogn. u. pharmakodynamischer Hinsicht, Pharm. Zeitschr. f. Rußland, 1895, S. 248.

Bisweilen finden sich Kieselkörper in Früchten und Samen. Crüger fand Kieselkörper in der Frucht von Scleria flagellum.

Schad[1]) beschreibt feinwarzige Körner in den Sklereiden der Samen von Elettaria cardamomum, Bochmann[2]) und Stscherbatscheff[3]) dergleichen in den Palisaden der Malvaceensamen, die vorher Lohde[4]) als Wandverdickungen angesprochen hatte. Anderseits sollen die zuerst von Beck beschriebenen Kieselsäure-Körperchen der Papilionaceen-Samen nach Mattirolo und Buscalioni[5]) Reste von Zellkernen sein. Wahrscheinlich werden sich, in vielen Fällen wenigstens, Kieselkörper dort im Samen finden, wo sie in den vegetativen Teilen der betreffenden Pflanzen auftreten.

Über das Vorkommen von Kieselkörpern in der Palisadenepidermis der Samenschale von Albizzia-Arten, sowie bei Afzelia africana und cuanzensis berichtet Solereder[6]).

Bei der Commelinee Campelia Zanonia kommen in der Oberhaut der Laubblätter und Stengel zahlreiche Zellen vor, die kleine warzenförmige Kieselkörper enthalten (H. Molisch[7])); ähnliche Körper beschrieb Möbius[8]) bei der Commelinee Callisia repens. Molisch[9]) fand ferner Kieselkörper in Blattstiel, Blattspreite und Stengel von Capparis callosa und javanica.

G. Borissow[10]) faßt die von Klinge[11]) in der Endodermis von Andropogoneen entdeckten Kieselkörperchen („Rasdorskysche Körperchen") als stiellose Kiesel-Cystolithen (oder der Solerederschen Terminologie entsprechend als „cystolithen-

[1]) A. Schad, Unters. über d. Malabar-Kardamomen, Berner Dissertat. 1897.

[2]) F. Bochmann, Samen und Früchte, Berner Dissertat. 1901.

[3]) D. Stscherbatscheff, Entw. einig. off. Pfl., Arch. d. Pharm., 1907, CCXLV, S. 48.

[4]) Lohde, Über den Bau einiger Samenschalen, Dissertat. Leipzig 1874.

[5]) O. Mattirolo u. L. Buscalioni, Ricerche anatomico-fisiologische sui tegumenti seminali delle Papilionacee, Accad. di Torino, 1892, XLII[2].

[6]) H. Solereder, Zur Struktur der Leguminosenschalen, insbesondere über das Vorkommen von Kieselkörpern in ihnen, Arch. d. Pharmaz., 1920, CCLVIII, S. 138.

[7]) H. Molisch, Über Kieselkörper in der Epidermis von Campelia Zanonia Rich., Ber. deutsch. bot. Ges., 1918, XXXVI, S. 277.

[8]) M. Möbius, Über ein eigentümliches Vorkommen von Kieselkörpern in der Epidermis und den Bau des Blattes von Callisia repens, Wiesner-Festschrift, Wien, 1908, S. 81.

[9]) H. Molisch, Über organische Kalkkugeln und über Kieselkörper bei Capparis, Ber. deutsch. bot. Ges., 1916, XXXIV, S. 154.

[10]) G. Borissow, Über die eigenartigen Kieselkörper in der Wurzelendodermis bei Andropogon-Arten, Ber. deutsch. botan. Gesellsch., 1924, XLII, S. 366; derselbe, Rasdorskys Körperchen beim Ravenna-Gras, ebenda, 1925, XLIII, S. 178; derselbe, Weiteres über die Rasdorskyschen Körperchen, Ber. deutsch. botan. Gesellsch., 1928, XLVI, S. 463.

[11]) J. Klinge, Vergleichende histologische Untersuchung über Gramineen- und Cyperaceen-Wurzeln, insbesondere der Wurzel-Leitbündel, St. Petersburg 1879.

ähnliche Bildungen“) auf und weist sie noch bei einer Anzahl von Andropogoneen nach; er weist sie außerdem nach in dem Rhizom von Andropogon halepensis Brot., in der Wurzelendodermis von „Erianthus Ravennae P. B. an der Peripherie der Wurzeln von Sorghum vulgare Pers. var. sudanensis und Andropogon halepensis Brot., sowie in den Luftwurzeln von Andropogon formosus Klotzsch. Die Körperchen sind von einer Membran umgeben, die bei den Andropogon-Arten verholzt ist. Sie lösen sich in Flußsäure; verwendet man sie nur in schwacher Konzentration und setzt außerdem Natriumchlorid hinzu, so erhält man die hexagonalen Kristalle des Natriumfluorsilikats.

Verkieselt sind die „rudimentären Cystolithen“ einiger Loranthaceen, Zellhautpfropfen in der Epidermis von Campanula persicifolia und runde Körper in der Epidermis der meisten Bromeliaceenblätter (Linsbauer).

Um Hinweise auf Kieselsäure zu erhalten, kann man Vorprüfungen anstellen. Bringt man nämlich, wie Küster fand, Präparate mit Kieselkörpern oder mit verkieselten Membranen in einen Tropfen Benzol, Nelkenöl oder Phenol, so nehmen verkieselte Bestandteile einen rötlichen Glanz an[1]). Am besten eignen sich hierzu das zuerst von O. Müller 1871 bei seinen Diatomeenstudien benützte Phenol, verharztes Nelkenöl und Monobromnaphthalin. Das Präparat gelangt trocken auf den Objektträger und wird mit einer kleinen Messerspitze kristallisierten Phenols bedeckt; das Phenol wird durch gelindes Erwärmen geschmolzen, dann abgesaugt und durch Nelkenöl ersetzt. Erforderlichenfalls kann in Kanadabalsam eingeschlossen werden. Selbst schwach verkieselte zarte Membranen lassen sich auf diese Weise herausfinden. Der rote Glanz wird wahrscheinlich durch den Brechungsunterschied von Objekt und Untersuchungsmedium bedingt. Ebenso wie Phenol wirkt bei eintägiger Einwirkung Millons Reagens (H. Molisch). Küster fand ferner, daß die Kieselkörper der Chrysobalaneen Methylenblau und Gentianaviolett speichern. Die gleiche Eigentümlichkeit zeigt übrigens Tabaschir; dieser Körper wird außerdem durch Jodchloroform und Jodschwefelkohlenstoff braun (Ambronn)[2]), ein Verhalten, welches die Kieselkörper der Chrysobalaneen nicht zeigen. Hingegen nehmen die Kieselfüllungen nach dem Glühen in violetter Jodlösung ebenfalls wie Tabaschir eine braune Färbung an. Das gleiche gilt von den verkieselten Membranen der Chrysobalaneen und auch nach Wieler[3]) von den Kieselausfüllungen der Interzellularen des interfaszikularen Grundgewebes von Saccharum.

[1]) E. Küster, Über Kieselablagerungen im Pflanzenkörper, Ber. deutsch. bot. Ges., 1897, XV, S. 136 und: Die anatomischen Charaktere der Chrysobalaneen, Bot. Zentralbl., 1897, LXIX, S. 46.

[2]) H. Ambronn, Mitt. an Küster, Ber. deutsch. bot. Ges., 1897, XV, S. 137.

[3]) A. Wieler, Beiträge zur Anatomie des Stockes von Saccharum, Fünfstücks Jahrb., 1897, II, 1.

Frohnmeyer macht von seinen mit absolutem Alkohol fixierten Internodienstücken Mikrotomschnitte von 5—10 μ Dicke, untersucht dann nach Küster in Phenol, legt dann in Nelkenöl und schließlich in Kanadabalsam. Phenol läßt im Gegensatz zu Küster nicht jede feinste Verkieselung erkennen. Daneben werden die für die Kieselerkennung mehr negativen Färbeverfahren (Chlorzinkjod, Kongorot) angewandt. Zur Färbung der mit Flußsäure entkieselten Schnitte wurde auch Safranin verwendete.

Pfeiffer durchtränkt neuerdings mit Hilfe des Transpirationsstromes die Gewebe mit Phenol.

Das Durchtränkungsverfahren kann mit dem Färbeverfahren vereinigt werden, wenn man Farbstoffe im Phenol auflöst. Um nicht durch den Geruch des Phenols belästigt zu werden, empfiehlt es sich, es mit Kollodium zu überschichten.

(H. Pfeiffer, Eine Verbesserung der Technik der Phenoldurchtränkung von Pflanzenzellen zwecks Nachweises von SiO_2, Ztschr. wiss. Mikrosk., 1929, XLVI, S, 491.)

Zur Durchführung der Versuche füllt man eine Reihe gleicher Reagensgläser mit der gleichen Menge kalter Phenollösung („gewöhnliche Handelsware") und bringt dieselbe Menge verschiedener Farbstoffe hinein. Nach kurzem Durchschütteln werden die Versuchspflanzen oder unverletzte Sprosse mit der Schnittfläche hineingestellt und je nach der Größe des Gegenstands und nach Lebhaftigkeit seiner Transpiration 10—40 Stunden unter transpirationsfördernde Bedingungen gebracht. Durch die Aufsaugung der Farbstoff-Phenollösung erhalten die Pflanzen eine für das Schneiden mit dem Rasiermesser geeignete Beschaffenheit. Man untersucht die Schnitte in kalter Phenollösung, die man noch zur Ersparnis noch so weit verdünnen kann, daß der rötliche Ton, den alte Lösungen zu haben pflegen, verschwunden ist.

(H. Pfeiffer, Protoplasma 1930, IX, S. 120.)

Zum Nachweis der Rasdorskyschen Körperchen behandelt Borissow die Präparate erst mit Javellescher Lauge und führt dann unter Benutzung von Karmin und Methylgrün (mit 2% Essigsäure), Safranin-Wasserblau oder Solidgrün-Deltapurpurin Doppelfärbungen aus. An den fertiggestellten Präparaten erschien die Endodermis blaugrün (mit Methylgrün), rot (mit Safranin) oder grün (mit Solidgrün) gefärbt; der mineralische Inhalt der in den Kammern der Zellwand gelagerten Kieselkörperchen bleibt farblos.

Lösungen basischer Farbstoffe (Methylenblau) in Wasser und besonders in Phenol beschleunigen die Bildung von SiO_2-Gelen aus SiO_2-Solen und sind deshalb geeignet, die SiO_2 in einem Stadium nach-

zuweisen, in welchem diese noch als Sol in den Zellen aufzutreten beginnt[1]).

Der gebräuchlichste Nachweis der Kieselsäure in Membranen oder in Zellinhalten geschieht durch Veraschung. Ist die Kieselsäure in den Membranen in größerer Menge abgelagert, dann bleiben die Präparate nach dem Glühen im Zusammenhang als sog. Kieselskelette. Die Präparate werden am besten auf einem Glimmerplättchen über einer Spiritusflamme geglüht. Nach dem Abkühlen wird das Plättchen auf einen Objektträger gelegt, dann wird etwas Wasser zugefügt; nach dem Auflegen eines Deckglases wird das Präparat mikroskopisch durchmustert. Es hält nun schwer, durch Glühen allein rein weiße Rückstände zu erzielen. Gewöhnlich sind gleichzeitig mehr oder weniger große braune oder schwarze Anteile von verkohlten Produkten zugegen. Es ist daher bei allen Objekten ratsam, den Glühprozeß durch die Wirkung von Säuren zu unterstützen. Die Präparate werden auf dem Glimmerplättchen in konzentrierter Salzsäure erhitzt, dann wird geglüht, der Asche nochmals ein Tropfen Salzsäure zugefügt und vorsichtig weiß gebrannt. Die Veraschung mit Salzsäure ist bei kieselsäurearmen Objekten, wie bereits Zimmermann angibt, dem Verfahren von Sachs vorzuziehen. Letzteres besteht darin, daß die Schnitte auf dem Glimmerplättchen in einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure geglüht werden. — Übrigens lassen sich störende Verkohlungsreste aus den Kieselskeletten oft durch vorsichtiges Durchsaugen von Salpetersäure entfernen.

Um von Blättern Skelette mit Zellstruktur zu gewinnen, ging Netolitzky folgendermaßen vor: Die möglichst ausgewachsenen Blätter werden im Platintiegel bei kleinster Flamme (um Schmelzungen zu verhüten) verascht. Man behandelt die Asche mit Salzsäure, verdünnt mit Wasser, läßt absitzen und mikroskopiert den Bodensatz.

Lehbert kocht die Gegenstände mit starker Salzsäure aus, wäscht aus und verglüht auf dem Platinblech. In einzelnen Fällen zog er — nicht immer mit Erfolg — die in der toxikologischen Chemie geübten Verfahren zur Mineralisierung der organischen Substanz heran: Erhitzen mit Kaliumchlorat und Salzsäure oder Salpetersäure-Schwefelsäure.

Auf Anregung von Sachs beschäftigte sich Miliarakis[2]) mit dem Nachweis und der Herstellung von Kieselskeletten. Seine Methode

[1]) H. Pfeiffer, Über Methoden zum Studium der Verkieselungsprozesse innerhalb lebender pflanzlicher Zellen, Arch. exp. Zellforsch., 1928, VI, S. 418, Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1928, XLV, S. 522.

[2]) Spyridion Miliarakis, Die Verkieselung lebender Elementarorgane bei den Pflanzen, Dissertation Würzburg 1884.

kombiniert die 1863 von Pollender zu gleichem Zwecke vorgeschlagene Chromsäure mit konzentrierter Schwefelsäure. Das zu untersuchende Material wird in toto in einem Becherglase mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt, bis diese durchsichtig geworden ist, oder falls zarte Blätter vorliegen, bis diese durchsichtig geworden sind. Nun wird eine 20proz. wässerige Chromsäurelösung zugefügt. Die Pflanzenstücke zerfallen unter heftiger Gasentwicklung. Nach Beendigung der Gasentwicklung wird mit destilliertem Wasser aufgefüllt, absetzen gelassen und nach vorsichtigem Abgießen der Flüssigkeit der pulverige Bodensatz in Untersuchung genommen. Im allgemeinen wird man die Reaktion auf dem Objektträger vornehmen und Präparate und nicht Pflanzenstücke verwenden. Die Schnitte kommen unter Deckglas in konzentrierte Schwefelsäure, nach einiger Zeit wird 20 % Chromsäure zugefügt, schließlich eine konzentrierte Chromsäurelösung, dann wird mit Wasser, wenn nötig mit Weingeist ausgewaschen.

Bei diesem Verfahren ist eine Glasbildung, bestehend aus Produkten der Kieselsäure mit Kalk-Magnesia-Salzen, die bei dem Glühen in Schwefelsäure auf Platinblech oder dem Glimmerplättchen häufig zu beobachten ist und welche die feinere Struktur der Skelette verwischt, ausgeschlossen. Andererseits wurde schon von Miliarakis, besonders aber von Kohl[1]) hervorgehoben, daß das Verfahren nur bei starker Verkieselung zusammenhängende Skelette liefert, während zarte Kieselskelette völlig aufgelöst werden. Um diesen Übelstand zu vermeiden, hat man nur nötig, mit dem Chromsäurezusatz vorsichtig zu sein und bei geringen Mengen Kieselsäure die Reaktion stets unter Deckglas vorzunehmen. Man setzt nach Einwirkung der Schwefelsäure zunächst eine 5proz. Chromsäurelösung zu, wäscht nach 1—2 Stunden mit Wasser aus und kontrolliert den Erfolg unter dem Mikroskop. Bei zu schwacher Einwirkung erfolgt nochmaliger Zusatz einer stärkeren Chromsäurelösung. Man gelangt derart stets zum Ziele. Die Reaktion ist bei einiger Übung leicht auszuführen und liefert, im Gegensatz zu dem Veraschungsverfahren, Präparate, die frei von störenden Verkohlungsresten sind.

Es war oben die Vermutung ausgesprochen, daß bei den der Wand anhaftenden, ins Zellumen hineinragenden Kieselkörpern die Zellulosegrundsubstanz (entgegen der Ansicht von Kohl) zuweilen übersehen worden ist. Bei Cyperus alternifolius (Blattepidermis) sehlug Zimmermann[2]) zur Erkennung der Zellulose das von Mohl (a. a. O.) benutzte

[1]) F. G. Kohl, Anatomisch-physiologische Untersuchung der Kalksalze und Kieselsäure, Marburg 1889, S. 226.

[2]) A. Zimmermann, Über eigenartige verkieselte Membranverdickungen im Blatte von Cyperus alternifolius, Beitr. z. Morph. u. Physiol. d. Pflanzenzelle, 1893, Heft III, S. 306.

Verfahren ein. Ein Platintiegel wird mit 3 g Flußspat und 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure beschickt. Darauf wird ein mit Wasser gefüllter Platinlöffel eingestellt, welcher die Schnitte enthält. Das Ganze gelangt auf einen Paraffinofen bei etwa 65°. Nach drei Stunden ist die Kieselsäure gelöst, denn das die Schnitte enthaltende Wasser hat genügend Flußsäure zur Lösung der Kieselsäure aufgenommen. Nach dem Auswaschen färbt Chlorzinkjod das Zellulosegerüst blau.

Die nach dem Netolitzkyschen Verfahren[1]) (s. oben) erhaltenen Skelette lassen sich mit Methylenblau färben. Auch mit Safranin, ebenfalls in essigsaurer oder neutraler Lösung, kann gefärbt werden. Beide Farbstoffe färben nur die Kieselsäure und nicht Tonerde und Kalk[2]). Mit dieser Methode hat Tunmann recht gute Erfahrungen gemacht und konnte sie auf dem Deckglase durchführen, wenn die Präparate in eine Ecke desselben gebracht wurden.

In vielen Fällen begnügt man sich mit den angeführten Reaktionen, zumal dann, wenn der Aschenrückstand weiß und unlöslich in Schwefelsäure ist. Besteht das Kieselskelett aus reiner Kieselsäure, dann darf es sich nur in Fluorwasserstoffsäure lösen. Die Reaktion mit dieser Säure ist umständlich, erfordert mehrere Vorsichtsmaßregeln und ein subtiles Arbeiten. Zunächst muß das Objektiv geschützt werden, indem man diesem mittels Kanadabalsam ein Stückchen Gelatine (Gelatina alba, Handelsware) aufklebt. Flußsäure ätzt bekanntlich Glas, kommt in Kautschukflaschen in den Handel, läßt sich auch in Merckschen Perhydrolflaschen aufbewahren und wird mit Platindraht auf den Objektträger gebracht. Letzterer wird durch eine dünne Schicht Kanadabalsam, Leim, geschmolzenen Paraffins oder Vaseline geschützt. Kärner[3]) legt zum Schutz auf den Objektträger ein Stück durchsichtigen Waschbarchentstoff, das vorher durch Reiben mit den Händen etwas erwärmt und geglättet wurde. Man kann auch den Objektträger mit einer dünnen Wachsschicht (Cera alba) überziehen. Rein weiße Kieselskelette lösen sich in Flußsäure innerhalb kurzer Zeit auf. In der durch Flußsäure bewirkten Lösung des Kieselskelettes ruft Zusatz von Natriumchlorid Bildung von Kieselfluornatrium-Kristallen hervor. Da aber das Abheben des Gelatine-Deckplättchen schwer durchführbar ist, so fügt man

---

[1]) F. Netolitzky, Verkieselungen bei den Rubiaceae Galieae, Öster. bot. Zeitschr., 1911, LXI, Nr. 11.

[2]) S. Keisermann, Kolloidchem. Beih., I, S. 423. — Haushofer empfahl bereits Fuchsinlösung zum Nachweis der amorphen, gelatinösen Kieselsäure, Mikr. Reakt., 1885, S. 121.

[3]) W. Kärner, Über den Abbruch und Abfall pflanzlicher Behaarung und den Nachweis von Kieselsäure in Pflanzenhaaren, Nova Acta Acad. Leop.-Carol., 1889, LIV, S. 219.

der Kieselsäure-Asche von vornherein Flußsäure zu, die mit etwas Natriumchlorid versetzt ist, und läßt langsam abdunsten. Die Kieselfluornatrium-Kristalle sind hexagonale Prismen, Pyramiden, Tafeln, sechsstrahlige Sterne und Rosetten[1]).

Molisch (Mikrochemie der Pflanzen, 2. Aufl. (1921), S. 74) benutzt diese Reaktion, um in Zellsäften gelöste Kieselsäure nachzuweisen. Man bringt einen Tropfen des ausgepreßten Saftes auf den gefirnißten Objektträger und setzt ihn dann den Dämpfen der Flußsäure aus, indem man das Präparat auf die Öffnung einer Flußsäureflasche bringt. Bei Gegenwart von Natrium und Kieselsäure entstehen die erwähnten Kristalle.

Titan

In Fucus, Pelvetia, Himanthalia, Ascophyllum, Cystosera, Aspergillus finden sich bis mehrere mg Titan in 1 kg frischer Pflanzensubstanz, in Champignonarten zehnmal weniger.

Pflanzenmikrochemisches nicht bekannt.

(G. Bertrand u. C. Voronca-Spirt, Compt. rend. Acad. sciences Paris, CLXXXIX, S. 73.) S. a. Chem. Centralbl. 1930, I, S. 1805.

Kalium

Kalium gehört zu den für höhere Pflanzen unentbehrlichen Elementen. Im Samen ist es hauptsächlich im Embryo und im Nährgewebe enthalten. Der Kaligehalt der Asche der Samen beträgt meist über 20 %, selten weniger (Piper nigrum 7 %). In der Rinde nimmt der Prozentgehalt mit dem Alter überwiegend ab, doch erscheint es fraglich, ob diese Abnahme auch eine absolute ist. Die Rindenasche führt durchschnittlich 3—8 % Kali. Kalireich sind die Rinden der Chinchonen (Zweigrinden) und von Daphne mezereum, arm an Kali die von Ulmus, Corylus u. a. Im Holze zeichnet sich der Splint durch hohen Kaligehalt aus. In der Asche des Holzes finden sich 15—25 %, doch auch 30—45 % Kali (Abies pectinata, Quercus). Reich an Kali sind die Blätter (30—55 %), vornehmlich die jugendlichen, später ist die Zunahme anderen Mineralstoffen gegenüber im allgemeinen gering. Weevers hat gezeigt, daß die Hauptmenge in den Vakuolen auftritt und daß das Cytoplasma gleichfalls Kaliumionen führt, während Zellkern, Chromatophoren, Chlorophyll kein Kalium enthalten (von Stocklasa wird Kalium im Chlorophyll angegeben). Kalireich sind Reservestoffbehälter, Vegetationspunkte, Siebteil und Parenchym (im Holz die Markstrahlen), arm an Kalium die wasserleitenden Elemente.

Besonders kalireiche Pflanzen sind noch: Menyanthes trifoliata, Papaver Rhoeas (ältere Stengel), Oxalis acetosella, Tropaeolum majus, Solanum tuberosum (Stengel und Knolle), Lactuca perennis (Milchsaft).

Das Kalium-Isotop Mol. 41 scheint in den Pflanzen angereichert (F. H. Loring u. I. G. F. Druce, Chem. News, 1930, CXL, S. 34).

K. Haushofer, Mikroskopische Reaktionen, Braunschweig, 1885, S. 98.

Vor dem Abfallen der Blätter wandert bei der Pappel $\frac{1}{3}$—$\frac{1}{4}$ des Kaliums in den Stengel, bei wintergrünen Blättern, wie Hedera, findet eine Veränderung nicht statt[1]).

Dem Kalium kommt bei den fundamentalen Prozessen der Photosynthese eine hervorragende Rolle zu. Die Reduktion der Kohlensäure findet im Kaliumbikarbonat statt. Für den Betriebsstoffwechsel in den chlorophyllhaltigen wie chlorophyllfreien Zellen ist das K-Ion gänzlich unentbehrlich. Durch die Radioaktivität des Kaliums wird die Mechanik des Stoff- und Gasaustauschs, überhaupt der ganze Bau- und Betriebsstoffwechsel jeder Pflanzenzelle beeinflußt[2]).

Die Resorption des K-Ions und seine physiologischen Wirkungen im Rübenorganismus werden durch das Vorhandensein des Natrium-Ions gefördert.

Kalium kann das Licht bei dem Aufbau der Eiweißstoffe in der Pflanzenzelle ersetzen (Stocklasa)[3]).

$K^{\cdot}$, $Na^{\cdot}$ und Mg'' deformieren wachsende Streckungszonen junger Wurzeln und lösen sie zuletzt auf; es handelt sich dabei um Oberflächenwirkungen, die durch $Ca^{\cdot\cdot}$ in richtiger Konzentration verhindert werden können (Hansteen-Cranner). K. befördert die Wasseraufnahme und setzt die Transpiration relativ stark herab, $Ca^{\cdot\cdot}$ wirkt umgekehrt (Derselbe).

Fig. 36. Urginea maritima (Zwiebelblatt, Längsschnitt), Kaliumnachweis mit Platinchlorid (Tunmann)

Kali vermehrt die Fasern und führt ihre geschlossene (durch Abeckung gekennzeichnete) Festigkeit herbei (Tobler)[4]).

Der Kaliumnachweis in den Präparaten hat einmal mit der Menge des anwesenden Kaliums zu rechnen und ist auch in einigen Fällen von der Art der Bindung desselben abhängig. Große Quantitäten von Kalium führen sinigrinhaltige Objekte, in denen neben den Nitraten, Sulfaten und Chloriden des Kaliums auch das im Gly-

[1]) Th. Sabalitschka und A. Wiese, Das Verhalten des Kalis vor und bei dem herbstlichen Absterben der Blätter von Populus nigra L. und Hedera helix L., Zeitschr. Pflanzenernährung, A, 1926, VII, S. 166.

[2]) J. Stocklasa u. A. Matouschek, Beiträge zur Kenntnis der Ernährung der Zuckerrübe. Physiologische Bedeutung des Kalium-Ions im Organismus der Zuckerrübe (Jena, G. Fischer, 1916).

[3]) J. Stocklasa, Ist das Kalium-Ion an der Eiweißsynthese in der Pflanzenzelle beteiligt?, Biochem. Zeitschr., 1916, LXXIII, S. 107.

[4]) F. Tobler, Zur Kenntnis der Wirkung des Kaliums auf den Bau der Bastfaser, Jahrbücher f. wiss. Bot., 1929, LXXI, S. 26.

Übersicht über die Funktionen von Kalium und Natrium nach Maiwald[1]).

Element		Wesentliche Funktionen ←	— — — — — —	→ Nebenfunktionen
Wirkung von K allein		Energieübertragung bei der Kohlehydratbildung (durch lichtelektrischen Effekt). Anwesenheit von K in assimilierenden Blättern notwendig	Transport und Umbildung der Kohlenhydrate; regelmäßige Anwesenheit von K in den Leitungsbahnen der Pflanze nachweisbar.	Wirkung als einwertiges Kation = „Ausgleichsstoff" (Ersatz des H in Pflanzensäuren durch K) Erhaltung des osmotischen Drucks.
Wirkung von Na allein		entsprechende wesentliche Wirkung fehlt; Na ist **entbehrlich** für höhere Pflanzen.	eine dem K ähnliche Wirkung bei der Stoffwechselregulierung kann vielleicht aus der oft beobachteten „Nützlichkeit" von Na neben K geschlossen, aber noch nicht bewiesen werden.	Ausgleichsstoff als einwertiges Kation. Wirkung wie bei K.
Wirkung von K und Na zusammen	a) rein physiologische Wirkung bei Ausschaltung jeglicher „Bodenwirkung"	erhöhte Verfügbarmachung von K für seine wesentlichen Funktionen.		wahrscheinlich Vertretung des K als Ausgleichsstoff durch Na. Wechselwirkung von K und Na an der Wurzelgrenzfläche in Gestalt gegenseitiger Aufnahmehemmung oder -förderung noch unerforscht.
		—	günstige Verstärkung der K-Funktion bei der Stoffwechselregulierung durch Na möglich (?).	
	b) im Falle möglicher „Bodenwirkung"	Es tritt **indirekte** Na-Wirkung auf durch Freimachung von K aus dem Wurzelort. Das geförderte Wachstum der Pflanze beruht also eigentlich auf einer zusätzlichen K-Wirkung. Die reinphysiologischen Wechselwirkungen unter a) können nebenhergehen, werden aber von der deutlichen K-Mehrwirkung meist überdeckt werden.		

[1]) K. Maiwald, Das Zusammenwirken der Elemente Kalium und Natrium beim Pflanzenwachstum, Chem. Ztg., 1929, LIII, S. 440.

kosid vorhandene Kalium in Reaktion tritt. Sinigrin führende Präparate können daher, neben dem Mesophyll der meisten Blätter, Siebteilen und Endosperm als erste Übungsobjekte dienen. Legt man einen Schnitt der Meerrettigwurzel trocken auf den Objektträger und fügt Platinchlorid hinzu, so entstehen momentan reguläre Oktaeder von Kaliumplatinchlorid, sowohl in den Zellen (Sinigrinzellen) als auch auf dem Präparate und im Beobachtungstropfen. Würfel entstehen selten; bei den Oktaedern fällt es auf, daß viele nur auf einer Hälfte zur Ausbildung gelangen. Auch Kombinationen von regulären Würfeln und Oktaedern sind nicht selten (Fig. 36). Häufig treten verzerrte Formen von sechsseitigem Umriß auf. Die Kristalle lösen sich unter Deckglas schwer in Wasser und in Weingeist, erst bei wiederholtem Durchsaugen von Wasser werden sie an-

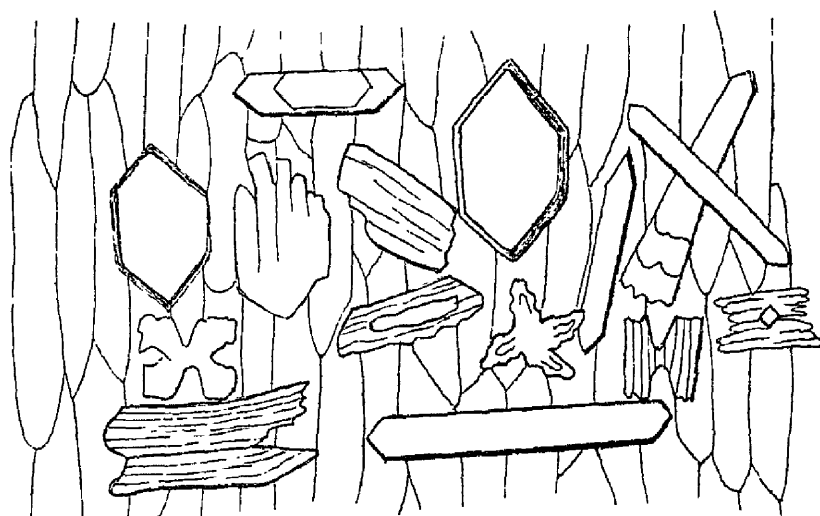



Fig. 37. Cochlearia armoracia (Wurzel, Längsschnitt des Markes), Kaliumnachweis mit Weinsäure und nachfolgendem Alkoholzusatz (Tunmann)

gegriffen. Sie vertragen ferner Zusatz von Glyzerin, lösen sich aber in Chloralhydratlösung, sowie in warmem Wasser. Gegenwart größerer Mengen von Pflanzensäure erschwert die Kristallisation. Außer dem Kalium treten zugleich die etwa anwesenden Salze von Rubidium, Caesium und Ammonium in Reaktion. Zu berücksichtigen sind in der Praxis nur Ammoniumverbindungen. Von der Anwesenheit etwaiger Ammoniumverbindungen hat man sich mit dem Nesslerschen Reagens zu überzeugen. Um aber bei der Reaktion Ammoniumverbindungen sicher auszuschließen, muß man die Präparate veraschen. Die Asche wird nach dem Vorgange Schimpers in einem Tropfen angesäuerten Wassers gelöst, bis zum Trocknen erwärmt und vor oder nach dem Erkalten Platinchlorid zugesetzt. Selbstverständlich muß das Platinchlorid auf Reinheit geprüft werden, vor allem frei von Kalium sein. Im wässerigen Auszug der Asche scheiden sich häufig große Würfel aus, die Chlorkalium darstellen. Bringt man einen Tropfen Platinchlorid

daneben und führt vorsichtig mit dem Platindraht eine Spur davon zum Kristall, so zerfällt dieser sofort in ein Haufwerk roter Körnchen.

Meist ist der Kaliumgehalt der Präparate ein geringer. Man erwärmt dann die Präparate auf dem Objektträger bis zum Eintrocknen und tropft auf den noch warmen Objektträger Platinchlorid auf. Auch bei Wurzelausscheidungen kann man Kalium direkt nachweisen, indem man die Flüssigkeit verdunsten läßt, einen Tropfen Platinchlorid zufügt und bedeckt (Czapek)[1]. In dem Rückstand des Sekretwassers von Phaseolus- und Malvaceenblättern wies Nestler[2] Kalium mit verdünnter Salzsäure als Chlorkalium sowie mit Platinchlorid nach; wahrscheinlich tritt dort kohlensaures Kali auf, denn der Rückstand, der federartige Bildungen zeigt, ist sehr hygroskopisch und bei Zusatz von Salzsäure erfolgt starke Gasentwicklung. In Glyzerinpräparaten scheiden sich bisweilen Kristalle von Kaliumverbindungen aus. Belzung[3] stellte derart bei Cucurbita pepo stäbchen- und tafelförmige Kaliumnitratkristalle fest.

Bisweilen liefert eine wässerige Weinsäurelösung (1 : 10) gute Dienste. Es bilden sich Täfelchen, Platten und Schollen von Kaliumbitartrat (Fig. 37). Der Weinsäurelösung bediente sich beispielsweise Guignard beim Nachweis des myronsauren Kaliums (s. Senfölglykoside). Anwesende Ammoniumverbindungen treten gleichfalls in Reaktion, können aber durch Veraschen der Präparate ausgeschlossen werden. Auch Kalzium wird als Tartrat gefällt. Die Reaktion läßt sich zum Kaliumnachweis auch bei Schnitten verwenden, wenn man die von Schoorl[4] bei reinen Substanzen gemachten Erfahrungen berücksichtigt. Das in Weinsäure liegende Präparat wird bis zum Kochen erhitzt, der noch heißen Lösung am Deckglasrande Weingeist zugesetzt, dann werden einige Tropfen Weingeist durchgesaugt. Dadurch wird sämtliches Kalium als Tartrat ausgefällt, das Natriumtartrat aber entfernt. Eine Lokalisation ist jedoch nicht zu ermitteln, selbst in der Kälte nicht. Die Kristalle polarisieren lebhaft (die typischen tiefblau und goldgelb) und lösen sich nicht in weingeistiger Chloralhydratlösung (gehen zum Teil in federartige Skelette über). Chloralalkoholat

[1] Fr. Czapek, Zur Lehre v. d. Wurzelaussch., Jahrb. f. wiss. Bot., 1896, XXIX, S. 321.

[2] A. Nestler, Die Sekrettropfen an den Laubblättern von Phaseolus multiflorus Willd. u. d. Malvaceen, Ber. d. bot. Ges., 1899, XVII, S. 332.

[3] E. Belzung, Sur divers principes issus de la germ. et leur crist. intercellul., Journ. de Bot., 1892, VII, S. 49.

[4] N. Schoorl, Beitr. z. mikrochem. Analyse, Wiesbaden, Sep. aus Zeitschr. f. analyt. Chem., 46.—48. Bd.

kann somit bei vorsichtigem Zusatz zum nachträglichen Aufhellen der Schnitte dienen.

Einige Kaliumsalze zeigen in Farbstofflösungen ein recht charakteristisches Verhalten. Kaliumsulfat scheidet in einer Lösung von Bismarckbraun fasrige, stark dichroitische Kristalle ab, Kalisalpeter bildete in Nigrosinlösungen violette dichroitische Säulen (Retgers)[1]. Das Verfahren muß erst näher bei pflanzlichen Präparaten ausprobiert werden. Einige Objekte, die stark kaliumhaltig waren, gaben nur einen kleinkörnigen oder flockigen Niederschlag.

Eine empfindlichere Reaktion ist die mit Natriumkobaltnitrit, die zum Kaliumnachweis in der Zelle zuerst von Macallum[2], in ausgedehnter Weise später von Weevers[3], benutzt wurde. 20 g Kobaltnitrat und 25 g Natriumnitrit werden in 10 ccm Eisessig und 65 ccm Wasser gelöst. Nach Beendigung der Stickstoffdioxydbildung wird auf 100 ccm aufgefüllt, mehrere Stunden absetzen gelassen (hierbei scheidet sich evtl. im Natriumnitrit vorhanden gewesenes Kalium ab) und filtriert[4]. Diese Natriumkobaltnitritlösung gibt mit Kaliumsalzlösungen einen feinen kristallinischen gelben Niederschlag von Kaliumkobaltnitrit, der im Gewebe jedoch meist schwer zu erkennen ist. Um den Niederschlag deutlich erkennen zu können, wird er in schwarzes Kobaltsulfid übergeführt. Kaliumkobaltnitrit löst sich leicht in Wasser von Zimmertemperatur, ist aber in Eiswasser (1—4°) unlöslich. Die Präparate, die einige Minuten in der Natriumkobaltnitritlösung gelegen hatten, werden daher mit Eiswasser oder nach Molisch besser mit 10proz. Essigsäure ausgewaschen (zur Entfernung des überschüssigen Reagens) und dann in ein Gemisch von gleichen Teilen Glyzerin und Ammoniumsulfid übertragen (letzteres kann man durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in Ammoniaklösung, spez. Gew. 0,96, leicht selbst herstellen). Auf diese Weise ist das schwer erkennbare gelbe Kaliumkobaltnitrit in das schwarze, kristallinische Kobaltsulfid übergeführt. Im allgemeinen durchdringt die Natriumkobaltnitritlösung schnell die Zellmembran, anderenfalls läßt sich das Eindringen des Reagens durch Erwärmen auf 60—70° beschleunigen. Fast stets entsteht die Fällung im Zytoplasma (auch in plasmolysierten Zellen), sehr selten in den Zellsaftvakuolen, doch ist diese Lokalisierung eine

[1]) J. W. Retgers, Über die künstl. Färb. v. Krist. org. Körp. mittels org. Farbst., Zeitschr. f. physikal. Chem., 1893, XII, S. 600.

[2]) A. B. Macallum, Journ. of physiol. 1905.

[3]) Th. Weevers, Unters. über die Lokalisation und Funktion des Kaliums in der Pflanze, Rec. d. Trav. botan. Néerl., VIII, S. 289.

[4]) Molisch (Mikrochemie der Pflanze, 2. Aufl. (1921), S. 63) empfiehlt, eine frisch bereitete gesättigte Lösung von Natriumkobaltnitrit in 10proz. Essigsäure zu verwenden.

sekundäre Erscheinung und zeigt die Berührungszone der in Reaktion tretenden Flüssigkeiten an. Im allgemeinen ist die Fällung in der Zelle gleichmäßig verteilt; findet an einer Stelle eine Anhäufung statt (Spitzen der Wurzelhaare), so beruht diese auf dem leichteren Eindringen des Reagens an der betreffenden Stelle (Fig. 38).

Nach Lloyd[1]) ist der Ausfall der Reaktion von der Leichtigkeit abhängig, mit der das Reagens durch verschiedene Stellen der Zellwand diffundieren kann, ferner von der Adsorption des Reagens durch Zellulose- und Schleimmembranen. Ein Irrtum kann dadurch bedingt

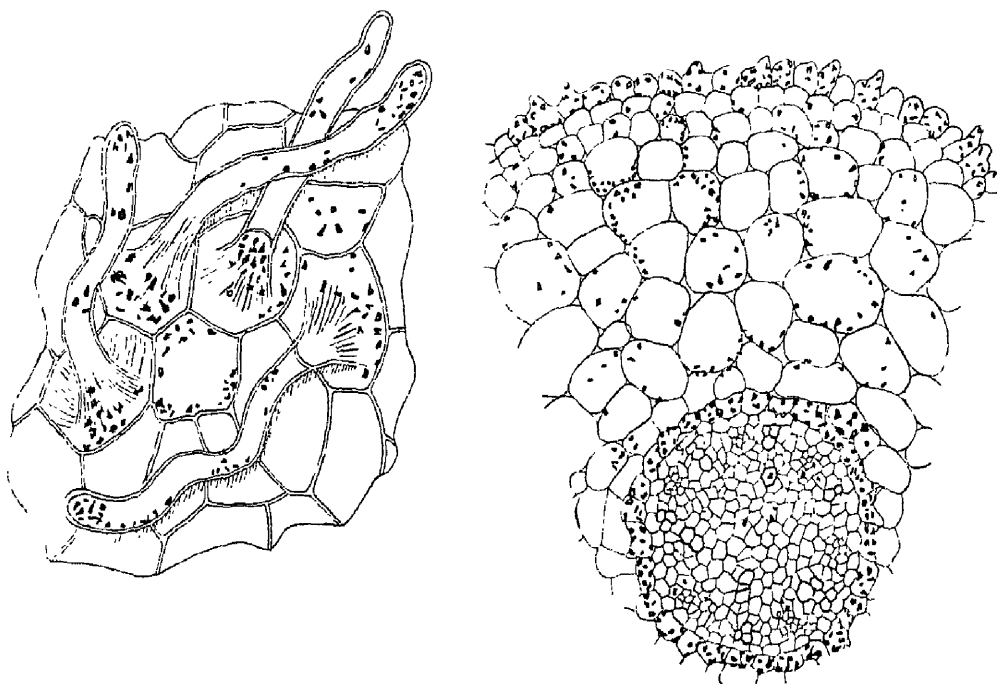



Fig. 38. Orchis spec. (2 mm starke Wurzel, Epidermis und Querschnitt). Kaliumnachweis mit Kobaltnitrit, Umsetzung des Niederschlages mit Ammoniumsulfid in Kobaltsulfid, welches eingezeichnet ist (Tunmann)

werden, daß das Reagens aus manchen Orten (Haare) nur schwer ausgewaschen werden kann.

Im Gegensatz zu Weevers (l. c. 173) fand Lloyd Kalium auch in den Cyanophyceen, in Übereinstimmung mit ihm nicht in dem Zellkern. Nach Liesegang[2]) eignet sich die Reaktion infolge von Diffusionsvorgängen überhaupt nicht zu Lokalisationsstudien.

Kisser[3]) verwendet zum Nachweis des Kaliums die Abscheidung als Kalium-Kupfer-Bleinitrit. Als Reagens braucht man eine Lösung

[1]) F. E. Lloyd, The cobalt sodium hexanitrite reaction for potassium in plant cells, Flora 1925, CXVIII u. CXIX, S. 369.

[2]) R. E. Liesegang, Über den angeblich lokalisierten Kalinachweis im Pflanzengewebe, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1929, XLVI, S. 126.

[3]) J. Kisser, Ein Beitrag zum histochemischen Nachweis des Kalium, Pharmazeut. Presse 1923, Folge 5.

von 20 g Natriumnitrit, 9,1 g Kupferazetat und 16,2 g Bleiazetat in 150 ccm Wasser, der man noch 2 ccm Eisessig zusetzt[1]). Es gibt mit Kaliumsalzen einen Niederschlag aus schwarzen oder braunen Würfeln oder Plättchen mit sechs- oder viereckigen Umrissen, deren dünnste Exemplare dunkelrot bis orangegelb erscheinen. Zur Ausführung der Reaktion bedeckt man die Schnitte auf dem Objektträger mit einem Tropfen des Reagens. Ein etwa störender Überschuß des Reagens läßt sich durch Durchsaugen von Weingeist entfernen.

Patschovsky[2]) legt die Schnitte entweder auf dem Objektträger in eine Lösung von Pikrinsäure in 96proz. Weingeist (Deckglas alsbald auflegen!) oder 1—2 Tage in ein Gläschen mit einer Lösung von Pikrinsäure in Benzol oder Petroläther. Die in beiden Fällen erhaltenen Kristalle des Kaliumpikrats (gelbe rhombische Nadeln) können in Glyzerin betrachtet werden, das sie nur langsam löst.

Zur sicheren Identifizierung kann man die Kristalle (nach Weglösen überschüssiger Pikrinsäure mit Weingeist) mit Natriumkobaltinitrit (S. 173) in die orangefarbenen Kristalle des Kaliumkobaltinitrits überführen oder noch besser (um Verwechslung mit Ammoniaksalzen zu vermeiden) in das Perchlorat (Reagens: Mischung gleicher Teile der 20proz. Lösung des Handels und 96proz. Weingeistes).

Ist in Schnitten kein Kalium nachweisbar, so kann man noch den Nachweis in der Asche versuchen, indem man ein wenig auf dem Objektträger mit gesättigter wässeriger Pikrinsäure-Lösung behandelt.

Über einige neuere Kaliumreaktionen, so die mit Silikowolframsäure[3]), liegen keine Erfahrungen auf dem Gebiete der pflanzlichen Mikrochemie vor.

Natrium

Über die physiologische Bedeutung des Natriums s. S. 170. Typische Natronpflanzen (Salsola) können auch bei Abwesenheit von Chlornatrium zu normalen Pflanzen erzogen und zur Fruchtbildung gebracht werden. Selbst bei Landpflanzen ist der Natriumgehalt sehr vom Boden abhängig und weist große individuelle Schwankungen auf[4]). Am reich-

---

[1]) Für den Nachweis sehr geringer Mengen von Kalium verwendet man ein Gemisch gleicher Teile einer Lösung, die die Salze in 75 ccm Wasser enthält und 96proz. Weingeist.

[2]) N. Patschovsky, Über einen mikrochemischen Nachweis des Kaliums als Kaliumpikrat, Ber. deutsch. bot. Ges., 1925, XLIII, S. 489.

[3]) Mit 10proz. Silikowolframsäure geben Kaliumsalze Büschel von Nadeln und Stäben, Ammoniumsalze dagegen Rhombendodekaeder und Würfel (Rosenthaler, Mikrochemie, 1924, II, S. 29.).

[4]) Der Na_2O-Gehalt der Erbsenreinasche schwankt zwischen 0,4 und 13,26 % und ist also stark von der Zusammensetzung des Bodens abhängig, Küster u. Umbrecht, Zeitschr. physiol. Chem., 1928, CLXXIX, S. 139.

lichsten findet sich Natrium in der Asche der Blätter, weit weniger ist es in Rinde und Holz zugegen, relativ mehr im Splint, und auch die Samenasche führt selten mehr als 2 %. Nach Osterhouts Untersuchungen[1]) ist Natrium den Pflanzen als Schutzstoff nützlich, für manche Meeresalgen als Schutzstoff unentbehrlich.

O. Richter stellte fest, daß Natrium ein notwendiges Nährelement für eine marine Leuchtbakterie ist[2]). Auch für Diatomeen ist es nach demselben Autor unentbehrlich (Denkschriften Kais. Akad. Wiss. Wien, 1909, LXXXIV, S. 666; Sitzgsber. derselben 1909, CXVIII, S. 1337).

Bertrand u. Perietzeanu[3]) fanden in 35 Pflanzen Natrium und schließen daraus, daß es wahrscheinlich bei allen Pflanzen existiert.

Fucus und verwandte Algen enthalten Kalium und Natrium. Das Verhältnis K/Na kann in vielen Fällen 1 übersteigen, bei den Landpflanzen immer.

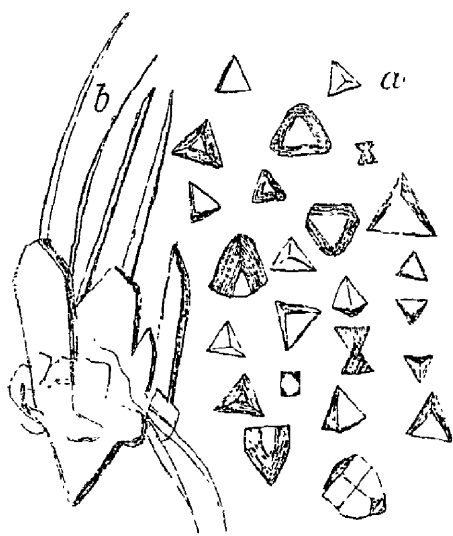



Fig. 39. Natriumnachweis, *a*) Kristallfällungen mit Uranylazetat in Schnitten von *Fucus spec.* *b*) ausgeschiedenes Uranylazetat (Tunmann)

Zum Nachweis von Natrium bedient man sich einer konzentrierten wässerigen Lösung von Uranylazetat (Streng, Schimper)[4]). Der Schnitt gelangt direkt in das Reagens, das Präparat wird aber nicht mit dem Deckglase bedeckt, sondern vor Staub geschützt zum Eintrocknen hingelegt, wenn nötig im Exsikkator nachgetrocknet. Bei Gegenwart von Natrium scheiden sich typische Kristalle von Natrium-Uranylazetat aus. Die kleineren Kristalle sind farblos, die größeren schwach gelb; es sind Tetraeder und Rhombendodekaeder, die im polarisierten Lichte nicht leuchten und sich leicht von dem gleichfalls ausscheidenden Reagens (Uranylazetat, große rhombische tafelartige Gebilde, die bei gekreuzten Nicols leuchten) scharf abheben (Fig. 39). Die Kristalle der Natriumverbindung zeichnen sich durch ihre dunklen

[1]) W. J. O. Osterhout, Die Schutzwirkung des Natriums für Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot. 1909, XLVI, S. 121.

[2]) O. Richter, Natrium — ein notwendiges Nährelement für eine marine mikroaerophile Leuchtbakterie, Anz. Akad. d. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., 1928, S. 163.

[3]) G. Bertrand u. J. Perietzeanu, Sur la présence du sodium chez les plantes, Compt. rend. Acad. sciences Paris, 1927, CLXXXIV, S. 645. Dieselben ebenda S. 1616, vgl. dazu G. André u. E. Demoussy, Sur la répartition du potassium et du sodium chez les végétaux, ebenda S. 1501.

[4]) A. Streng, Über eine neue mikroskopisch-chemische Reaktion auf Na-

Flächen aus; nach längerem Liegen an der Luft erscheinen sie bei durchfallendem Lichte fast schwarz. Zuweilen ist es ratsam, die Schnitte zuvor mit einer Spur Essigsäure zu befeuchten. Bei Anwesenheit von Magnesium resultieren keine Tetraeder, sondern rhomboedrische Kristalle von Uranylmagnesium-natriumazetat. Vorwiegend entstehen die Fällungen außerhalb der Zellen.

Uranylazetat muß frei von Natrium sein. Spuren von Natrium werden entfernt, indem man Uranylazetat in absolutem Alkohol löst, die Lösung filtriert und eindampft. Ein reines Präparat erhält man ferner, wenn man die Lösung der Handelsware mit Schwefelammonium fällt, das gebildete Schwefeluran gut auswäscht, in Essigsäure löst und das sich abscheidende Uranylazetat umkristallisiert. Zum Aufbewahren der Uranlösung lassen sich mit Vorteil Mercksche Perhydrolflaschen verwenden, da die Lösung aus dem Glase des Gefäßes leicht Natrium aufnehmen kann. Am einfachsten ist es, die erforderliche Lösung aus dem gelben kristallinischen Pulver in einem Tropfen stark verdünnter Essigsäure auf dem Objektträger jedesmal frisch zu bereiten und keine Lösung vorrätig zu halten.

Nach Schoorl[1]) erweist sich in der Chemie Ammoniumuranylazetat als ein ausgezeichnetes Reagens, welches noch 0,01 μg Natrium anzeigt (Bildung von Tetraedern). Ist aber gleichzeitig viel Kalium zugegen, so muß dieses zuvor entfernt werden. Die Kristalle können weiter nach dem Borodinschen Verfahren identifiziert werden.

Empfindlicher ist der Nachweis mit Zinkuranylazetat[1]), einer Mischung der Lösungen von 10 g Uranylazetat, 6 g 30proz. Essigsäure, Wasser zu 50 g und 30 g Zinkazetat, 3 g Essigsäure, Wasser zu 50 g, die man warm miteinander mischt. Am nächsten Tag filtriert man vom abgeschiedenen Natriumuranylzinkazetat ab. Zusatz von Weingeist verschärft die Reaktion. In der Pflanzenmikrochemie liegen über diese Modifikation noch keine Erfahrungen vor. Dasselbe gilt für die Verwendung von Magnesiumuranylazetat.

Man mischt eine Lösung von 10 g Uranylazetat, 6 g Essigsäure, Wasser zu 50 ccm mit einer ebensolchen Lösung von 33 g Magnesiumazetat, läßt einige Tage stehen und filtriert, wenn nötig. Zusatz von Weingeist verschärft die Reaktion (Kolthoff, Pharmac. Weekbl. 1923, LX, S. 1251).

trium, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, S. 129 und: A. F. W. Schimper, Zur Frage der Assimilation der Mineralsalze durch die grüne Pflanze, Flora, 1890, LXXIII, S. 215.

[1]) N. Schoorl, Chem. Weekbl. 1911, VIII, S. 266.

J. M. Kolthoff, Ein spezifisches Reagens auf Natrium, Zeitschr. analyt. Chem., 1927, LXX, S. 397. W. P. Malitzky u. W. A. Tubakajew, Über den mikrochemischen Nachweis von Natrium mittels Zinkuranylazetat, Mikrochemie, 1929, VII, S. 334.

Zum Nachweis des Natriums neben viel Kalium wird noch folgendes Reagens empfohlen[1]).

I. 40 g krist. Uranylazetat, 30 g Eisessig, 500 ccm Wasser. II. 200 g krist. Kobaltazetat, 30 g Eisessig, 500 ccm Wasser. Man erwärmt I und II getrennt auf 75° bis zur Lösung, mischt, kühlt auf 20° ab und filtriert. Zusammensetzung des Niederschlags ungefähr $3\,UO_2.(C_2H_3O_2)_2.Co(C_2H_3O_2)_2.NaC_2H_3O_2.6\,H_2O$.

In der Asche wird Natrium auf gleiche Weise nachgewiesen. Nach dem Ausziehen der Pflanzenasche mit Wasser scheiden sich beim Eintrocknen des Auszuges häufig große farblose Würfel ab, die aus Chlornatrium bestehen, deren Natrium ebenfalls mit Uranylazetat nachgewiesen wird.

Alkalisch reagierenden Aschen muß vor dem Zusatz des Uranylazetats Essigsäure bis zur neutralen oder schwach sauren Reaktion hinzugesetzt werden.

Ein weiteres Reagens auf Natrium ist Kaliumpyroantimoniat, mit dessen etwa 1proz. Lösung scherenartige oder X-förmige, zigarren- oder wetzsteinförmige Wachstumsformen oder (bei geringer Übersättigung) schön ausgebildete Oktaeder entstehen. Ob die Reaktion in der Pflanzenmikrochemie brauchbar ist, ist zweifelhaft, da sie durch viele andere Metalle, auch Kalzium und Magnesium gestört wird.

Als Hilfsreaktion läßt sich, wenn auch nicht immer mit gleichem Erfolg, Platinchlorid verwenden. Während die typischen kleinen Kristalle von Kaliumplatinchlorid (S. 171) sich bereits im Reagenztropfen abscheiden, bilden sich die weit größeren, flachen, schief auslöschenden Tafeln und Prismen von Natriumplatinchlorid erst nach Verdunsten der Lösung.

Ammonium

Als Stickstoffquelle für die jedenfalls in den grünen Laubblättern vor sich gehende Eiweißsynthese kommen neben den Nitraten des Bodens auch Ammoniumsalze in Betracht, die in den wasserleitenden Geweben in die Blätter geleitet werden. Gegenüber den Ammoniumverbindungen des Bodens sind die Ammoniakmengen der Luft von untergeordneter Bedeutung. Doch sollen (A. Mayer und L. Koch) die Blätter kleine Mengen Luftammoniak aufnehmen können. Daß die Wurzelhüllen der Orchideen Luftammoniak aufnehmen, war bereits älteren Untersuchern bekannt, und für Odontoglossum Barkeri hat Goebel (1889) die Absorption von Luftammoniak experimentell nachgewiesen. Im allgemeinen ist aber die Aufnahme von Ammoniumverbindungen recht gering, größere Mengen nehmen nur säureliebende Pflanzen, besonders Sumpfpflanzen, auf[2]).

[1]) E. R. Caley, Ein neues qualitatives Reagens für Natrium, Journ. Amer. chem. Soc., 1929, LI, S. 1965.

[2]) P. Ehrenberg, Mitt. landw. Inst. Breslau, 1907, IV, S. 254.

Freies NH_3 kommt in Bakterienwurzelknöllchen vor, auch in einigen Kryptogamen. Ammonsalze finden sich in allen Arten mit Ausnahme der mykotrophen und insektivoren der Moorböden[1]).

Die ektotrophe Mykorrhiza von Fagus und Pinus und die epidermale Mykorrhiza der Erikaceen geben keine oder nur schwache Reaktion auf Ammonsalze. Viel von letzteren enthalten einige Liliaceen und Cruciferen, besonders Lauch- und Kohlarten.

Bei Wasserkulturen von Pisum sativum und Fagopyrum esculentum ist Zusatz von Ammoniumsalzen zur Croneschen Lösung ohne Einfluß auf den Ammongehalt der Blätter.

Weitergehende Angaben über die Verbreitung des Ammoniaks finden sich in den Arbeiten von Klein u. Steiner und Steiner u. Löffler (Jahrbücher. f. wiss. Bot. 1928, LXVIII, S. 602; 1929, LXXI, S. 463.

Nach W. Müller, der wie Weevers Ammonsalze in vielen grünen Pflanzen findet, treten Ammonsalze in den „Ammonkulturen" reichlicher auf, als in den Nitratpflanzen. Er konnte sie vornehmlich in den Wurzeln nachweisen, am Licht werden sie anscheinend sehr schnell verarbeitet[2]).

Ammoniak ist die erste und letzte Stufe in den Umwandlungen der stickstoffhaltigen Pflanzenstoffe; es wird in den Keimlingen bei Gegenwart von Kohlenhydraten oder Fetten in Asparagin oder Glutamin übergeführt.

Ähnlich scheint ganz allgemein in der Pflanze Ammoniak als Produkt der oxydativen Eiweißspaltung aufzutreten und bei genügender Gegenwart von Kohlenhydraten zur Bildung anderer Stoffe verwendet werden.

In Rheum hybridum hort. geht die Bildung von Ammoniak und die von organischen Säuren einigermaßen parallel. (Ruhland u. Wetzel[3]).) „In Blüten und Blättern entsteht dauernd Ammoniak, das auch in kleinen Mengen regelmäßig und andauernd entweicht." (Klein u. Steiner[4]).)

Zur Untersuchung auf Ammonsalze bediente man sich früher meist des von Strasburger[5]) zuerst für mikrochemische Zwecke benutzten Nesslerschen Reagens, welches freies und gebundenes Ammoniak anzeigt.

Nach E. Schmidt erwärmt man 2 g Kaliumjodid, 5,0 g Wasser und 3,2 g Quecksilberchlorid, verdünnt die Lösung nach dem Erkalten mit 20 g Wasser,

[1]) T. Weevers, Das Vorkommen des Ammoniaks und der Ammonsalze in den Pflanzen, Rec. trav. bot. Néerl., 1916, XIII.

[2]) W. Müller, Über die Abhängigkeit der Kalkoxalatbildung in der Pflanze von den Ernährungsbedingungen, Beihefte z. bot. Centralbl., 1922, XXXIX, S. 321.

[3]) W. Ruhland u. K. Wetzel, Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen, Planta, 1927, III, S. 765.

[4]) G. Klein u. M. Steiner, Stickstoffbasen im Eiweißabbau höherer Pflanzen, I. Ammoniak und flüchtige Amine, Jahrbücher f. wissenschaftl. Bot., 1928, LXVIII, S. 602.

[5]) E. Strasburger, Bot. Praktikum, III. Aufl., 1897, S. 141. — M. Molliard, Sur la formation d'ammoniaque par les tissus végétaux privés d'oxygène, Bull. Soc. bot. de France, 1909, LVI, S. 332.

filtriert und setzt eine Lösung von 13,4 g Ätzkali und 26,6 g Wasser zu. Nach v. Friedrichs schüttelt man 2 g Kaliumjodid und 3,5 g feinzerriebenes Quecksilberjodid mit 3 ccm Wasser, setzt 60 ccm 5 n-Kalilauge hinzu und verdünnt die Mischung auf 100 ccm. Nach einigen Tagen wird klar abgegossen oder durch Asbest filtriert.

Bei Gegenwart geringer Mengen Ammoniak entsteht mit Nesslerschem Reagens sofort eine gelbe Färbung, die (und dies ist zu beachten) in einiger Zeit in eine gelbliche Fällung übergehen muß, jedenfalls nicht, ohne ein körniges Gerinnsel zu hinterlassen, verschwinden darf. Bei Anwesenheit größerer Mengen folgt der Gelbfärbung innerhalb weniger Minuten ein brauner Niederschlag. Versuchsobjekte sind die Stengel der Helianthus-Arten, vorzüglich das periphere Markparenchym. Hier läßt sich die Reaktion mit bloßem Auge verfolgen, wenn man den Objektträger über eine weiße Unterlage hält. Durch weitere Reduktion wird die braune Fällung nach einiger Zeit in ein dunkles Gerinnsel übergeführt, das makroskopisch grau, mikroskopisch schwarz erscheint. Der flockig-körnige Niederschlag sammelt sich an den Zellwänden an. Der Nachweis mit dem Nesslerschen Reagens ist keineswegs eindeuitg. Nickel[1]) zeigte, daß viele organische Verbindungen die gleiche oder doch eine ähnliche Reaktion geben. Zuweilen bestehen Unterschiede in der Endphase der Reaktion. In vitro verursachen Aldehyde rotbraune, zuletzt graue, Ammoniaksalze aber anfangs gelbe, schließlich gelbrote Färbung oder Fällung. Im Gewebe können auch Saponine, selbst Zucker Anlaß zu Irrtümern geben[2]).

Fig. 40. Helianthus annuus (Mark). Fällungen bei Alkoholzusatz, zum Teil Ammoniumsalze; rechts zwei nativ vorkommende Oxalate (Tunmann)

Läßt man auf frische Schnitte von Helianthus-Stengeln Weingeist einwirken, dann scheiden sich innerhalb weniger Minuten zahlreiche Kristalle aus, teils kleine Stäbchen und Tafeln, teils X-förmige Skelette, die sich zu drusenförmigen Gebilden vereinen. Zuweilen kommt es zur Bildung federartiger Kristallgruppen, die sich in einigen Zellen anhäufen.

[1]) E. Nickel, Die Farbenreaktionen der Kohlenstoffverbindungen, Berlin 1890.

[2]) L. Rosenthaler, Das Verhalten von Nesslers Reagens gegen einige Glykoside (speziell Saponine) und Kohlenhydrate, Pharmaz. Centralh. 1906, XLVII, S. 581.

Diese Kristalle, die sich leicht in Wasser lösen, reagieren positiv mit Nessler. Sie bestehen wahrscheinlich aus Ammoniumsalzen (Fig. 40). Tragen wir die Präparate statt in Weingeist direkt in eine weingeistige Lösung von Nigrosin ein, dann erscheint eine Anzahl der Kristalle mehr oder weniger bläulich bis violett. Ein Teil der Kristalle bleibt farblos, ebenso das nativ auftretende Kalziumoxalat. Diese Reaktion stimmt mit den Befunden von Retgers[1]) überein, nach dem Ammoniumnitrat den Farbstoff aus Indulin- und Nigrosinlösungen aufnimmt. Im Gewebe fällt die Reaktion nicht so klar aus, wie mit reinen Substanzen, da sich andere Körper mehr oder weniger mitfärben.

Mit Weinsäure hat Dębski[2]) in Marantaceen Ammonium nachgewiesen.

Wegen der Unsicherheit der genannten Reaktionen benutzte Tunmann Magnesiumsulfat und Natriumphosphat, welche Haushofer[3]) empfahl. Die Schnitte müssen mit einer Spur verdünnter Natronlauge alkalisch gemacht werden. Bei Helianthus waren die Erfolge allerdings nicht befriedigend, die Kristalle fielen sehr schlecht aus.

Weevers wandte zum Nachweis des Ammoniaks folgendes Verfahren an: Man bringt auf den Boden der Molischschen Gaskammer 25 mg der zu prüfenden Gewebestückchen, fügt gepulvertes Magnesiumoxyd und einen Tropfen Wasser hinzu und legt daneben einen kleinen Wattebausch mit Chloroform. Am Deckglas bringt man einen Tropfen Platinchloridlösung[4]) an.

Über das Verfahren von Klein und Steiner und das von Steiner und Löffler s. Abschnitt „Flüchtige Amine“.

Kalzium

Kalzium ist für die meisten höheren Pflanzen unentbehrlich. Manche Pilze und viele Algen[5]) können ohne Kalzium gedeihen; für einige Sumpf- und Wasserpflanzen sind Kalziumverbindungen sogar giftig. Die physiologische Bedeutung

[1]) J. W. Retgers, Über die künstliche Färbung von Kristallen organischer Körper mittels organischer Farbstoffe, Zeitschr. f. physikal. Chem., 1893, XII, S. 600.

[2]) B. Dębski, Über den Bau und Bewegungsmechanismus der Blätter der Marantaceen, Anz. der Krakauer Akad., 1895, S. 244.

[3]) K. Haushofer, Mikr. Reakt., 1885, S. 13.

[4]) Das Platinchlorid muß — wegen der Bildung von der Ammoniumverbindung isomorphen Kaliumplatinchlorids — frei von Kalium sein. Man löst in destilliertem Wasser, das in Quarzgeräten destilliert war, und bewahrt die Lösung in Quarzgeräten.

[5]) Eine Zusammenstellung der kalkbedürftigen und der kalkfreien Algen und Pilze siehe O. Loew, Über das Kalkbedürfnis von Algen und Pilzen, Biol. Centralbl. 1925, XLV, S. 122.

des Kalks ist jedenfalls in mehr als einer Richtung zu suchen. Die Giftwirkung von Natrium- und Kaliumchlorid wird durch Kalziumchlorid aufgehoben (Maschhaupt); auch größere Gaben von Ammonium- und Magnesiumsalzen wirken ohne Kalk giftig (Faack)[1]. Unter den zweiwertigen Metallen, die die Säureresistenz der Zellen von Elodea und der roten Rübe erhöhen, haben Ca-Salze die stärkste antitoxische Wirkung (Prianischnikow). Vgl. a. S. 169 und W. Mevius, Kalzium-Ion und Wurzelwachstum, Jahrbücher f. wissensch. Bot. 1927, LXVI, S. 183.

Verschiedentlich schrieb man dem Kalzium eine Funktion beim Transport der Glykosen zu, da bei Kalziummangel Störungen im Stofftransport beobachtet wurden. Doch diosmieren Kalkglykosen nicht besser als reine Glykosen. Eine wichtige Aufgabe des Kalziums besteht wahrscheinlich darin, daß es die Giftwirkung löslicher organischer Säuren, besonders der Oxalsäure, unschädlich macht und die Säurebildung in der Pflanze reguliert. Auch bei der Zuckersynthese scheint ihm eine Bedeutung zuzukommen. Auf die Entwicklung der Wurzeln übt es einen günstigen Einfluß aus, Spuren von Kalzium sind bei Penicillium glaucum zur Konidienbildung nötig[2].

Über die verschiedenen Formen der Kalziumverbindungen in den Pflanzen siehe S. P. Kostytschew und W. A. Berg, Compt. rend. Acad. sciences U. R. S., S. 1929, S. 1; nach Chem. Centralbl. 1930, I, S. 539.

In den Blättern steigt der Kalkgehalt im Laufe der Vegetation. Im Holz sind beträchtliche Mengen zugegen. Kalziumabscheidungen können die Elemente im Kern- und Wundholz völlig verstopfen (S. 155). Unter den Aschenbestandteilen des Holzes und der Rinden (besonders der älteren) nimmt Kalzium die erste Stelle ein. Relativ gering ist der Gehalt in Samen, erreicht aber in bestimmten Fällen in der Samen- und Fruchtschale hohe Werte. Es beteiligt sich nicht nur am Aufbau der Zellwände und tritt in großen Quantitäten in anorganischer Bindung auf, sondern ist Bestandteil wichtiger Eiweißkörper (Globoide u. a.), findet sich wohl auch in Zellkern und Chromatophoren.

Chromatium Linsbaueri Gicklhorn und Rhabdochromatium Linsbaueri Gicklhorn lagern große Mengen von amorphem Kalziumkarbonat im Zellinnern ab, so daß der gleichfalls vorhandene Schwefel fast verdeckt wird (Gicklhorn, Ber. deutsch. bot. Ges., 1921, XXXIX, S. 312).

Bei manchen Algen (Corallinaceen, Lithothamnium, Melobesiaceen, Halymeda u. a.) werden Kalkkriställchen in die Zellwand eingelagert und verschmelzen miteinander zu einem schwammförmigen Gerüst (Grüss)[3].

Kugeln des Kalksalzes einer organischen Säure fand Molisch[4] in Parenchymzellen des Blattstiels, der Lamina und des Stengels von Capparis callosa und

[1] Vgl. dazu W. Mevius, Kalzium-Ion und Wurzelwachstum, Jahrbücher f. wiss. Bot., 1927, LXVI, S. 183.

[2] H. Coupin, Influence du calcium sur le Penicillium glaucum Compt. rend. Acad. sciences, Paris, 1927, CLXXXIV, S. 760.

[3] Grüss, Lithogene und normale Verkalkung, Ber. deutsch. bot. Ges., 1919, XXXVII, S. 531.

[4] H. Molisch, Über organische Kalkkugeln und über Kieselkörper bei Capparis, Ber. deutsch. bot. Ges., 1916, XXXIV, S. 154.

javanica. Molisch[1]) fand weiter Kalkkristalle in der Epidermis der Blätter von Bambusa stricta. Exkretbehälter können als Kalkspeicher dienen (Onken[2])). Siehe a. M. Grzenkowski, Die Kalkreinigung der höheren Pflanzen, Bot. Arch., 1929, XXIV, S. 325.

Im Wundholz oder ähnlichen Geweben sind Kalkablagerungen häufig, im Splintholz und normalen Kernholz sind sie selten (Record).

Kristalle von Kalziumverbindungen gelangen zum kleineren Teil in der Zellwand zur Ausscheidung. Überwiegend entstehen die Kristalle im Zellinhalt und zwar, wie schon Wakker[3]) zeigte, in den Vakuolen, auch dann, wenn nachträglich eine Verwachsung mit der Zellwand erfolgt. Die Bildung der Kristalle in den Vakuolen läßt sich in vielen Fällen in den jugendlichen Zellen durch Plasmolyse mit 4proz. Rohrzuckerlösung ermitteln. Außerdem bedient man sich mit Vorteil einer 10proz. durch Eosin rotgefärbten Salpeterlösung. Die Kristalle sind dann stets innerhalb der Vakuole sichtbar. Beim Umlegen des Mikroskopes folgen sie dem Gesetz der Schwere und nehmen die tiefste Stelle in der Vakuole ein.

Zum mikrochemischen Nachweis des Kalziums im Gewebe und in den einzelnen Zellbestandteilen stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Zum Nachweis des Kalziums in allen Verbindungen, auch den Oxalaten, lassen sich Schwefelsäure und Jodsäure verwenden.

Von Schwefelsäure benützt man eine verdünnte Säure. Eine allgemein gültige Vorschrift für die Konzentration der Säure läßt sich nicht geben, da die schnellere oder langsamere Bildung des Sulfates von verschiedenen Faktoren abhängt, jedenfalls auch von der Art der Bindung des Kalziums. Doch kann es vorkommen, daß die Ausscheidung von Gipskristallen unterbleibt, trotzdem Kalzium (winzige Oxalate) im Gewebe zugegen ist und zuvor mikroskopisch ermittelt wurde. Dies kann geschehen, wenn die Kalziummenge gering und der Zusatz an Schwefelsäure reichlich ist. Die kleinen Quantitäten von Kalziumsulfat werden von der Schwefelsäure in Lösung gehalten. Kommt es nicht auf Feststellung der Lokalisation an, dann ist es oft ratsam, das Präparat in 5proz. Schwefelsäure zu erhitzen und der noch heißen Lösung einige Tropfen Weingeist zuzufügen. Die Abscheidung des Gipses vollzieht sich auf diese Weise schneller und die Kristalle fallen größer aus.

[1]) H. Molisch, Über Riesenkieselkörper im Blatte von Arundo donax, Ber. deutsch. bot. Ges., 1918, XXXVI, S. 474.

[2]) A. Onken, Über die Bedeutung des Milch- und Schleimsaftes für die Beseitigung des überschüssigen Kalziums. Ein Beitrag zur Exkretphysiologie der höheren Pflanzen, Bot. Arch., 1922, II, S. 281.

[3]) J. H. Wakker, Studien über die Inhaltskörper der Pflanzenzelle, Jahrb. f. wiss. Bot., 1888, XIX, S. 423.

Bessere Ergebnisse erzielt man nach Kisser[1]), wenn man ein Gemisch von 10—15 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure und 10 ccm Weingeist verwendet. Die Reaktion eignet sich in dieser Form zum Nachweis der Lokalisation, da der Weingeist nicht nur die Löslichkeit des Reagens herabsetzt, sondern auch sein rasches Eindringen verursacht. Handelt es sich lediglich um den Nachweis löslicher Kalziumverbindungen, so kann man den Weingeist durch Eisessig ersetzen.

Der Reaktion haftet der Mangel an, daß sie neben dem Kalzium der Zellinhalte gleichzeitig das der Membranen anzeigt. Allerdings läßt sich durch Digerieren der Präparate mit Wasser und durch Alkoholbehandlung das Kalzium aus den Zellinhalten zum größten Teile entfernen (mit Ausnahme von Kalziumoxalaten und -silikaten), so daß Vergleichspräparate einen annähernden Schluß gestatten, inwieweit bei

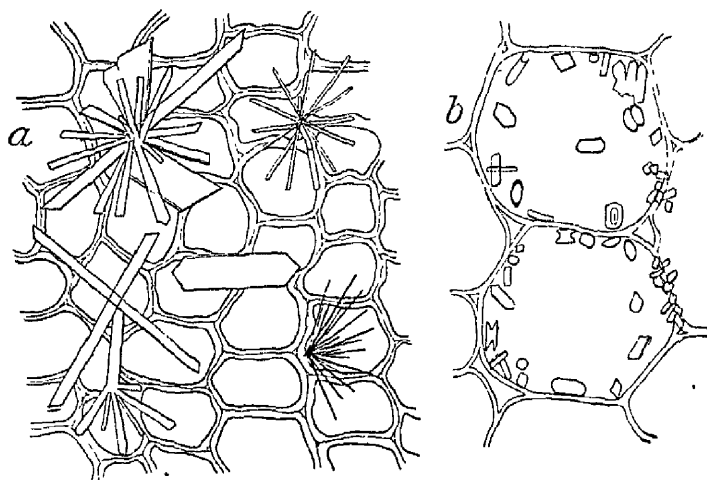



Fig. 41. Kalziumnachweis; a) Laminaria Cl. (Schnitt mehrere Tage gewässert, dann 2% Schwefelsäure), Kalziumsulfatkristalle; b) Jatrorrhiza palmata, Wurzel (kristallfreies Holzparenchym des Zentrums), Kalziumoxalatkristalle mit Ammoniumoxalat gefällt (Tunmann)

der Sulfatfällung Membran- oder Zellinhaltkalzium beteiligt ist. Eine Verwechslung mit anderen durch Schwefelsäure entstehenden Kristallen ist nicht ausgeschlossen, trotzdem die Gipskristalle eine ungemein typische Form besitzen. Es sind lange Prismen oder tafelförmige Kristalle mit stumpfwinkligen Endflächen. Die Tafeln verwachsen zuweilen zu Zwillingskristallen und zwar derart, daß der Kantenwinkel 140° oder 130° beträgt (Haushofer). Bei Geweben wird man Tafeln relativ selten antreffen (Fig. 41a). Je konzentrierter die benutzte Säure ist, um so schneller erfolgt die Ausscheidung und um so mehr überwiegen Nadeln (die sog. Gipsspieße), welche sich sternförmig gruppieren. Werden die Kalzium- oder die Gipskristalle in konzentrierter Schwefel-

[1]) J. Kisser, Beitrag zum histochemischen Nachweis des Kalziums, Pharmazeutische Presse, 1923, Folge 4.

säure erhitzt, so gehen sie in Anhydrid über und bilden sofort ein wirres Geflecht kleiner feiner Nadeln, welches die Gestalt des ursprünglichen Kristalles noch im Umriß erkennen läßt (Fig. 42). Zuweilen zeigt übrigens die Lage der Gipsnadeln (auf der Membran oder im Zellinhalte) die Herkunft des Kalziums an, wenn die Präparate direkt in Schwefelsäure eingetragen werden. Die Gipskristalle müssen mikrochemisch näher geprüft werden. Sie sind unter Deckglas unlöslich oder doch schwer löslich in Wasser (Gips löst sich in 386 Teilen Wasser bei 18°, geringe Gipsmengen sind unter Deckglas sehr wohl in Lösung zu bringen, besonders bei Gegenwart von Salzsäure oder Salpetersäure) und unlöslich in Weingeist (Unterscheidung von Alkaloidfällungen u. a.). Chlorbaryumlösung, vornehmlich bei Zusatz von etwas Salzsäure, überzieht die Gipskristalle mit einer Kruste von Baryumsulfat (s. Schwefelsäure). Ferner

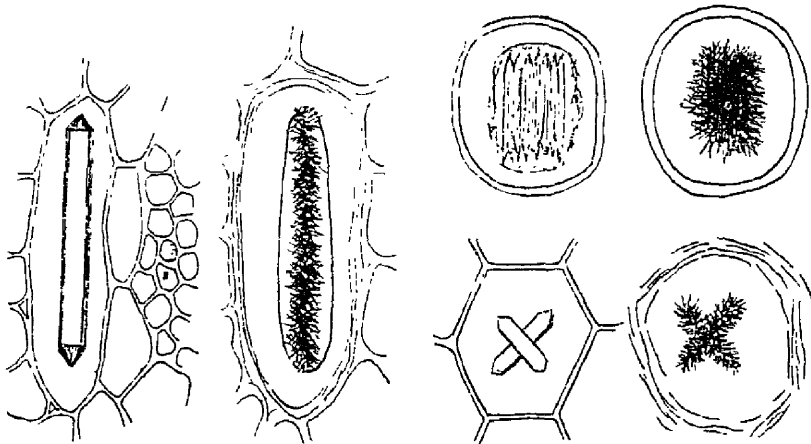



Fig. 42. Kalzium(-oxalat)-kristalle mit konz. Schwefelsäure erhitzt; Bildung von Kalziumsulfat-Anhydrid (Tunmann)

kann man die Gipskristalle in weinsauren Kalk überführen. Man saugt die Präparate trocken und fügt einen Tropfen Seignettesalzlösung hinzu. Die Gipsspieße lösen sich und weinsaurer Kalk kristallisiert in starken Prismen aus. Die weinsauren Salze von Baryum und Strontium zeigen die gleichen Kristallformen, sie kommen aber bei Pflanzen nicht in Betracht.

Zum Nachweis des Kalziums in der Pflanzenasche bedient man sich einer verdünnten Schwefelsäure (2—4%). Bei Gegenwart reichlicher Mengen Kalk wird die Säure direkt der Asche zugefügt, bei geringem Kalkgehalt zieht man die Asche mit einem Tropfen Wasser aus, zieht den Tropfen beiseite und läßt ihn mit Zusatz einer Spur Schwefelsäure eintrocknen. War der Kalk als Sulfat in der Asche zugegen, dann erfolgt seine Ausscheidung im Auszuge auch ohne Zusatz von Schwefelsäure.

Jodsäure (gewöhnlich in 10proz. Lösung verwendet) bildet mit allen Kalziumverbindungen Kalziumjodat, das meist in Doppelpyramiden

(Oktaedern) auftritt. Auch Kalziumoxalat wird angegriffen; Erhitzen beschleunigt die Reaktion.

Zum Nachweis von Kalzium in isolierten Globoiden der Aleuronkörner benützte Pfeffer[1]) eine ammoniakalische Lösung von Ammonchlorid und Ammonoxalat. Die sich ausscheidenden Kristalle von Kalziumoxalat werden weiter identifiziert.

Die Abscheidung als Oxalat wird auch häufig zum Nachweis gelöster Kalziumverbindungen verwendet.

Größere Pflanzenstücke werden nach Acqua[2]) in einer 2proz. wässerigen Oxalsäurelösung mazeriert, dann mit destilliertem Wasser gut ausgewaschen, schließlich in Weingeist gehärtet und nicht zu dünne Präparate angefertigt. Schimper[3]) bediente sich einer wässerigen Lösung von Ammoniumoxalat, wobei sehr kleine doppelbrechende tetragonale Pyramiden entstehen. Wurden die Schnitte direkt in eine kochende Ammonoxalatlösung eingetragen, dann entstanden ovale Formen des monoklinen Systems. Das Reagens ist sehr empfindlich, bei Benutzung reiner Lösungen wird Kalknitrat noch in einer Verdünnung von 1 : 20 000 nachgewiesen. Nachprüfungen zeigten, daß zu den Reaktionen vorteilhaft die Oxalsäure in 2—3proz. Ammoniumoxalat in 3—5proz. wässeriger Lösung benutzt werden. Beide Reagentien liefern die gleichen Kristallformen (Fig. 41b). Eine Verwechslung der Oxalatfällungen bei rein optischer Betrachtung mit eventuellen Ausscheidungen der Reagentien (bei Anwendung konzentrierter Lösungen) ist nicht zu befürchten. Überdies lassen sich die Reagentien durch Auswaschen mit Wasser aus den Schnitten entfernen, während die entstandenen Kalziumoxalate zurückbleiben und ein Aufhellen der Schnitte mit Chloralhydrat gestatten. Ein Nachteil der Reaktion liegt darin, daß die Kalziumoxalatfällungen aus sehr kleinen Kristallen bestehen. Im allgemeinen ist das in der Kälte gefällte tetragonale Kalziumoxalat kleiner als das monokline, welches beim Aufkochen fällt. Ersteres ist meist so klein, daß man es bei starker Vergrößerung (600fach) betrachten muß, und läßt sich gut mit winzigen Stärkekörnchen vergleichen. Im Mark einjähriger Pflanzen erscheinen die chlorophyllfreien, kalkhaltigen Zellen, die nicht angeschnitten wurden, fast schwarz von den zahlreichen Kalziumoxalatkriställchen. Aber auch die größeren, beim Aufkochen erhaltenen Kristalle besitzen nur einen Durchmesser von 10—15 μ. Bei

---

[1]) W. Pfeffer, Jahrb. f. wiss. Bot., 1872, VIII, S. 429.

[2]) C. Acqua, Einige Beobachtungen über den Entstehungsort des Kalziumoxalates in den Pflanzen, Malphighia, 1889, III, S. 160, Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., 1889, VI, S. 544.

[3]) A. F. W. Schimper, Zur Frage der Assimilation der Mineralsalze, Flora 1890, LXXIII, S. 211.

mehrstündigem Liegen erzielt man etwas größere Kristalle. In amylumreichen Geweben (Wurzeln) sind naturgemäß die Fällungen kaum oder doch nur sehr schwer zu erkennen. Am besten wird die Stärke durch Aufkochen verkleistert. Doch müssen die Präparate vorher 15 Minuten im Reagens gelegen haben, so daß das Kalzium bereits kristallinisch ausgefällt wurde und aus den Zellen nicht mehr austreten kann. Schließlich ist es unbedingt erforderlich, Vergleichspräparate zu durchmustern und sich mit Schwefelsäure (1+3,0 Wasser) oder 10proz. Jodsäurelösung von der Natur der Fällungen zu überzeugen.

Molisch[1]) benützt zum Nachweis gelöster Kalkverbindungen die schon von Behrens angewandte Fällung mit Soda (10proz. bis nahezu gesättigte Lösung von wasserfreiem Natriumkarbonat), durch die der Kalk als Karbonat oder Gaylussit (Kalk-Natronkarbonat $Na_2CO_3 \cdot CaCO_3 + 5H_2O$) abgeschieden wird. Letzterer bildet monokline Prismen in verschiedener Ausbildung. Zur Einübung der Reaktion empfiehlt Molisch Crassulaceen, Cacteen, Euphorbiaceen, Stengel und Blattstiele von Boehmeria, Pelargonium zonale, Primula obconica, Plectranthus fruticosus und Begonia rex. Man bringt entweder die Schnitte in das Reagens oder ganze Organe (letztere auf mehrere Tage). Die überschüssige Soda kann aus den Präparaten mit verdünntem Weingeist (gleiche Raumteile von Weingeist und Wasser) weggewaschen werden; Kalzium, Natrium und Kohlensäure lassen sich dann in den Kristallen auf bekannte Weise nachweisen.

In sehr kalkreichen Geweben (Beisp. Sempervivum tectorum) erhält man neben dem Gaylussit Sphärite von Kalziumkarbonat.

Zum Nachweis löslicher Kalksalze, auch der schwer löslichen wie Kalziumkarbonat und Kalziumsulfat verwendet Kisser[2]) eine $^1/_{100}$-n-Pikrolonsäure 0,264 g auf 100 ccm Wasser). Es entstehen damit monokline Prismen, warzenartige Gebilde, die selten 20 μ überschreiten, ferner ab und zu kleinere Nadelbüschel derselben Größe und große lockere von etwa 100 μ und mehr, letztere jedoch nur bei Gegenwart großer Ca-Mengen. Kalziumoxalat wird nicht angegriffen.

Bei der Prüfung von Pflanzenaschen ist es nach Kisser vorteilhaft, die Asche zuerst mit Salzsäure aufzunehmen, eintrocknen zu lassen und dann erst auf Kalzium zu prüfen.

Ein anderes Kissersches Verfahren[3]) läßt das Kalzium mit Seignettesalz als Tartrat nachweisen.

[1]) H. Molisch, Über den Nachweis von gelösten Kalkverbindungen mit Soda, Ber. deutsch. bot. Ges., 1916, XXXIV, S. 288.

[2]) J. Kisser, Über die Verwendbarkeit der Pikrolonsäure zum mikro- und histochemischen Nachweis des Kalziums, Mikrochemie, 1923, I, S. 25.

[3]) J. Kisser, Über den mikrochemischen Nachweis gelöster Kalziumsalze in der Pflanze als Kalziumtartrat, Beihefte z. bot. Centralbl., 1923, XXXIX, S. 116.

Man erwärmt einen großen Tropfen 10proz. Seignettesalzlösung auf dem Objektträger, bis er zu dampfen beginnt und legt dann rasch den Schnitt hinein. Waren lösliche Kalziumsalze zugegen, so fallen die Kristalle des Kalziumtartrats aus. Es sind rhombische Prismen, deren Enden gewöhnlich durch ein unregelmäßig ausgebildetes Doma abgeschlossen sind, so daß die Kristalle monoklinen Habitus zeigen oder wie Rhomboeder aussehen (Fig. 43).

Die von MacCallum und Weyland empfohlene Verwendung von Hämatoxylin zur Färbung unlöslicher Kalksalze ist nach Salomon nicht zu empfehlen. Dagegen läßt sich Purpurin (Grandis und Mainani, Emich, Keisermann) verwenden. Man bringt nach Salomon[1]) die Schnitte in eine ammoniakalische Lösung von Anthrapurpurin (1, 2-,

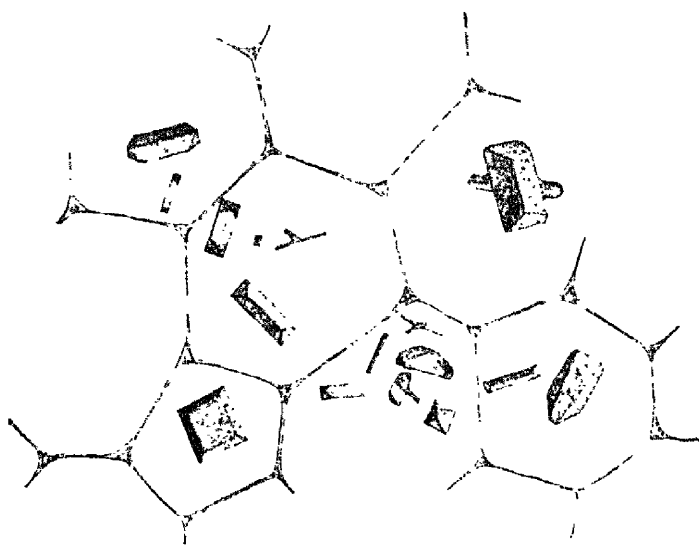



Fig. 43. Parenchymzellen aus einem jungen Sproß von Eupatorium adenophorum nach Behandlung mit einer 10proz. Lösung von Seignettesalz (Kisser)

7-Trioxyanthrachinon), der man 1 % Natriumchlorid hinzugefügt hat. Nachdem die Schnitte mit der Farblösung völlig durchtränkt sind, läßt man noch einige Minuten einwirken und wäscht mit ammoniakalischem Wasser den Überschuß an Farbstoff aus. Überall, wo Kalzium vorhanden war, beobachtet man Lilafärbung oder violette Körnchen.

Zum Nachweis des Kalziums injiziert Pollack[2]) Alizarin mit einer Mikropipette ins Plasma (einer Amöbe), worauf sich das Kalzium-Alizarinat als kleine rote Kristalle ausscheidet.

[1]) H. Salomon, Über das Vorkommen und die Aufnahme einiger wichtiger Nährsalze bei den Flechten, Jahrbücher f. wiss. Bot., 1914, LIV, S. 309.

[2]) H. Pollack, Micrurgical studies in cell physiology, VI Calcium ions in living protoplasm, Journ. of Gen. Physiology, 1928, XI, S. 539.

Der Vollständigkeit halber sei noch nachfolgendes Verfahren von Cretin[1]) angegeben. Mir selbst ist es nicht gelungen, damit brauchbare Ergebnisse zu erhalten.

Man erhitzt in einem Reagenzglas 1 g Gallussäure und 5 ccm 20proz. Formol bis zum Aufkochen und gibt, nachdem man das Glas vom Feuer entfernt, tropfenweise ½ ccm 5proz. Ammoniak hinzu. Die zuerst rote Flüssigkeit wird hellgelb und ist in diesem Zustand (nicht mehr, wenn sie braun geworden) zu verwenden. Immer frisch bereiten. Man gibt nun entweder einen kleinen Tropfen der noch warmen Lösung für 10—15 Sekunden (nicht länger, da sonst braun) auf den Schnitt oder stellt den Objektträger für 2—3 Sekunden in die Lösung. Bei Gegenwert von Kalzium Blaufärbung. Abwaschen in fließendem Wasser, Färbung ev. mit Safranin-Orange, Eosin-Orange, zuletzt rasch durch absol. Alkohol, Chloroform, Xylol, Einschluß in Zedernöl.

Die große Empfindlichkeit des Nachweises (chemisch-analytisch 1 : 1 000 000) kann noch gesteigert werden, wenn man nach der zweiten Ausführungsweise den Objektträger aus der Lösung über eine Ammoniakflasche bringt; die großen Kalziumgebilde werden dann braun.

Zur Unterscheidung von Kalkphosphat und -oxalat, die beide gleichzeitig in den kugeligen Gebilden lebender Zellen einer Cyperus-Art auftreten (s. Phosphorsäure, S. 148), hat Zimmermann[2]) oxalsaures Ammon mit Essigsäure kombiniert, wodurch der an die Phosphorsäure gebundene Kalk gelöst wurde und zugleich in Reaktion trat, während der an Oxalsäure gebundene Kalk jener Sphärite, der den Kern bildet, ungelöst blieb. Die betreffenden Schnitte wurden in 10proz. Ammoniumoxalat, dem 1% Essigsäure zugesetzt war, erhitzt. Die aus phosphorsaurem Kalk bestehenden Schalen der Sphärite verwandelten sich in Klumpen winziger Kriställchen, die sich nicht in 5proz. Essigsäure, jedoch leicht in Salzsäure lösten. In einer Lösung von 0,5% Ammoniumoxalat und 1% Essigsäure erfolgt die gleiche Reaktion, zwar erst nach ½ Stunde, aber ohne Erwärmen.

Eine besondere Erwähnung verdient der Nachweis des Kalziums in den Cystolithen. Cystolithen (im wahren Sinn) sind nach H. Pfeiffer[3]) in der Epidermis und im Mesophyll des Blattes und in Mark und Rindenkörper der Achse auftretende, meistens mit $CaCO_3$ und SiO_2 oder mit einer dieser Substanzen inkrustierte Membranauswüchse von gewöhnlich ausreichend erkennbarer Gliederung in einen verschieden be-

[1]) A. Cretin, Sur un nouveau réactif du calcium applicable aux recherches histologiques (Bull. d'histol. appl. et de techn. micr., 1924, I, S. 125; Ref. in Zeitschr. wiss. Mikroskop., 1925, XLII, S. 455.

[2]) A. Zimmermann, Über Kalziumphosphatausscheidungen in lebenden Zellen, Beitr. z. Morph. u. Physiol. d. Pflanzenzelle, 1893, H. III, S. 311.

[3]) H. Pfeiffer, Bemerkungen zur Klassifikation zentripetaler Wandverdickungen der Pflanzenzelle, Ber. deutsch. bot. Ges., 1929, XLVII, S. 141.

schaffenen Stiel und einen nach Form und chemischem Aufbau sehr variablen Kopf; die anorganische Inkrustierung kann in bestimmten Fällen wechseln oder abnehmen oder einer Verholzung Platz machen, zumal infolge pathologischer Veränderungen oder beim Altern der Gewebe. Auch der Stiel kann fehlen. Für die Gesamtheit der nach dem chemischen Aufbau abweichenden, morphologisch aber dem Typus noch nahen Gebilde schlägt Pfeiffer die Bezeichnung Cystotylen vor und schließt darin Resinocysten, Mucocysten und Sphärocysten ein. Als Membraninklusionen werden die Protuberanzen der Außenmembran der Campanulaceen und Bromeliaceen bezeichnet. Protuberanzen der inneren und seitlichen Membran sind die Duval-Jouveschen und Rasdorskyschen Körperchen (s. S. 162). Die sog. kalkfreien Cystolithen der Acanthaceen sind normale Kalkcystolithen, die in einem vorgeschrittenen Entwicklungszustand eine Entkalkung erfahren (Linsbauer)[1]).

Mit dem Schwinden des Kalks tritt Verholzung und Pektinmetamorphose ein.

„Das Schicksal der Cystolithen ist je nach Organ und Gewebe, in dem sie auftreten, verschieden. Die Pflanze entledigt sich ihrer beim Laubfall oder, sofern sie im peripheren Gewebe des Stammes liegen, durch Peridermbildung oder sie erfahren eine Entkalkung unter Sklerosierung des Lithocysten“ (Linsbauer). Letzteres ist bei mehreren Acanthaceen beobachtet worden.

Von diesen typischen Cystolithen unterscheidet man die „Harz-Cystolithen“ (Resinocysten) der Begoniaceen und den „Schleim-Cystolithen“ der Urticacee Girardinia palmata. Über Kiesel-Cystolithen s. S. 162. Weitere Literatur über Cystolithen:

H. Molisch, Über kalkfreie Cystolithen, Österr. bot. Zeitschr., 1882, Nr. 11.

K. Linsbauer, Über die kalkfreien Cystolithen der Acanthaceen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1921, XXXIX, S. 41.

A. Zalewski, Über Schoenetts Resinocysten, Bot. Centralbl., LXX, 1897.

F. Schorn, Über Schleimzellen von Urticeen und über Schleimcystolithen von Girardinia palmata.

Gaudich, Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math. nat. Kl., 1. Abt., 1907, CXVI.

[1]) K. Linsbauer, Über die kalkfreien Cystolithen der Acanthhaceen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1921, XXXIX, S. 41.

Zum Nachweis des Kalziums bei den **Cystolithen**, bei denen nach Giesenhagen nur kohlensaurer Kalk teils an Zellulose gebunden ist, teils frei auftritt, wandte Zimmermann[1]) stark verdünnte Schwefelsäure an (1 %), wodurch sich die Gipsnadeln in der Umgebung der Cystolithen abscheiden. Die Schnitte können auch direkt in eine siedende Lösung eingetragen werden, die 0,5 g oxalsaures Ammon und 1,0 g Essigsäure auf 100,0 Wasser enthält. Es bilden sich stark lichtbrechende drusenartig verwachsene Kristalle von Kalziumoxalat. Bei Anwendung einer kalten konzentrierten Lösung (10 % oxalsaures Ammon, 1 % Essigsäure) wird aber oxalsaures Ammon in den Cystolithen niedergeschlagen, welche sich bei mikroskopischer Betrachtung nicht verändert zeigen. Wird die konzentrierte Lösung heiß angewandt, dann erhalten die Cystolithen eine körnige Oberfläche, die aus Kalkoxalat besteht, während der Kern noch unverändertes Karbonat enthält. Neben dem Karbonat findet sich in den Cystolithen übrigens Kieselsäure, die aber auf den Stiel und den Kern beschränkt ist. Die Grundmasse der Cystolithen besteht aus Zellulose; die Cystolithen werden nach dem Lösen des Kalkes mit Salzsäure durch Chlorzinkjod violett. In den Blättern der Coccinia-Arten sind im Gerüst der Cystolithen außer Zellulose noch andere Substanzen zugegen, denn man muß nach Avetta[2]), um die Chlorzinkjodreaktion zu erhalten, die Grundsubstanz zuvor nacheinander mit Salzsäure und Kalilauge behandeln. Übrigens hatte schon vorher Mangin[3]) neben Zellulose Pektinsubstanzen und namentlich Callose nachgewiesen, wie denn Callose in mit kohlensaurem Kalk inkrustierten Wänden häufig vorkommt. Die Strukturverhältnisse lassen sich nach Giesenhagen[4]) am besten an Ficus-Blättern beobachten. Frische Blätter werden von der Epidermis befreit, ein starker Tangentialschnitt wird aus dem freigelegten Gewebe hergestellt und dieser auf Holundermark in Gummiglyzerin eingetragen. Diese Masse dringt in die geöffneten Zellen ein. Nach dem Eintrocknen der Masse sind die Cystolithen fest eingebettet und die Schnitte fallen tadellos aus.

[1]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik.

[2]) C. Avetta, Über die Cystolithen der Blätter von einigen Coccinia-Arten, Annuario d. R. Ist. Bot. di Roma, 1894, V, S. 181.

[3]) L. Mangin, Sur la constitution des cystolithes et des membranes incrustées de carbonate de chaux, Compt. rend., 1892, CXV, S. 260.

[4]) C. Giesenhagen, Das Wachstum der Cystolithen von Ficus elastica, ein Beitrag zur Kenntnis des Dickenwachstums vegetabilischer Zellhäute, Flora, 1890, LXXIII, S. 1.

Molisch[1]) gibt noch einige andere Reaktionen für Cystolithen an: Mit löslichen Silbersalzen Schwarzfärbung, mit Goldchlorid rot bis blauviolett, mit Ferrosulfat rostrot, mit Nickelsulfat blaßgrün, mit Kobaltchlorid und Kobaltsulfat lila oder rosarot.

Zur Übersicht über die Verteilung der Cystolithen verascht Naumann[2]) kleine Teile der Blätter in einem Porzellantiegel und trägt die zurückbleibenden Lamellen auf eine dünne Schicht Kanadabalsam auf.

Magnesium

Magnesium ist als Bestandteil des Chlorophylls (Willstätter) für grüne Pflanzen unentbehrlich. Der Chlorophyllgehalt ist von der zur Verfügung stehenden Mg-Menge abhängig (Mameli). Ausdauernde Gewächse verfahren mit dem Magnesiumgehalt ökonomisch, beim Blattfall wandert das Magnesium des Chlorophyllgrüns in den Stamm zurück (Stahl). Im Samen sind Beziehungen zwischen dem Magnesiagehalt und den gespeicherten Reservestoffen zu erkennen. Aleuronhaltige Samen führen im allgemeinen mehr Magnesia (Amygdalus 17 %) als stärkehaltige. Erstere besitzen bekanntlich Magnesium in den Globoiden der Aleuronkörner. Ein häufiger Bestandteil der Samen ist das Phytin (Kalzium-Magnesiumsalz der Inositphosphorsäure). Die Asche der Samenkerne ist reicher an Magnesia als an Kalk (E. Schulze), die gleichen Verhältnisse sind im Mehl, in der Kleie und im Getreide (Weizenmehl 11,22 Magnesia, 6,32 Kalk, Gerstenmehl 13,50 Magnesia und nur 2,80 Kalk, Willstätter). In der Asche des Holzes beträgt der Gehalt an Magnesia 5—10, steigt aber auch bis 20 und 25 % (Larix, Quercus, Betula). Die Rindenasche führt hingegen nur 2—6 % (Daphne mezereum über 12 %). In den Blättern schwankt der Gehalt von Spuren (Gramineen) bis zu 25 % (Beta vulgaris) und selbst 28 % (Solanum tuberosum). Manche Milchsäfte sind besonders reich an Magnesium-Verbindungen, so der vom Ficus elastica (Molisch). Über den Mg-Gehalt grüner und etiolierter Pflanzen siehe R. Rißmann, Planta, 1929, IX, S. 195.

Über die Wirkung der Magnesiumsalze, W. Zörkendörfer, Biochem. Ztschr. 1930, CCXXI, S. 33.

Die Giftwirkung der Magnesiumsalze beruht auf der Verdrängung von Kalzium durch Magnesium.

(O. Loew, Über das Verhalten des Zellkernes zu verschiedenen Giften, Biochem. Zeitschr. 1916, LXXIV, S. 376.)

[1]) H. Molisch, Über das Verhalten der Cystolithen gegen Silber- und Metallsalze, Ber. deutsch. bot. Ges., 1918, XXXVI, S. 477. Die von Molisch wohl mit Recht als Reduktion aufgefaßte Schwarzfärbung durch Silbersalze kann nicht durch das Kalziumkarbonat zustande kommen, sondern durch die organischen Stoffe der Cystolithen.

[2]) E. Naumann, Mikrotekniska Notiser, Bot. Notiser, 1915, S. 49; Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk. 1915, XXXII, S. 346.

Von den Methoden, die zum Nachweis von Magnesium im Gewebe benutzt werden können, hat sich diejenige am meisten eingebürgert und am besten bewährt, welche bereits Pfeffer[1]) bei seinen grundlegenden Arbeiten über die Aleuronkörner benutzte und die das Magnesium als Magnesiumammoniumphosphat zur Kristallisation bringt. Die Kristallformen sind in Fig. 34, S. 142 dargestellt. Pfeffer isolierte die Globoide und versetzte sie unter Deckglas mit einer ammoniakalischen Lösung von Chlorammonium und phosphorsaurem Ammoniak. Schimper (Lit. S. 123, 4) benutzte später eine mit etwas Chlorammonium versetzte Lösung von Natriumphosphat. Die Präparate, die vorher nicht gewässert sein dürfen, werden direkt mit dem Reagens versetzt, worauf sich phosphorsaure Ammoniak-Magnesia in den Zellen in Form charakteristischer, sargdeckelförmiger Kristalle abscheidet. Wenn man in gleicher Weise die Asche einiger Präparate behandelt, dann bilden sich überwiegend X-förmige Kristallskelette.

Fig. 44. Kristalle von Magnesiumammoniumphosphat,) aus dem Milchsaft von Lactuca virosa, b) aus dem harzigen Sekret von Pinus (Tunmann)

Plahl[2]) wies Magnesium in Nelken nach, indem er die Schnitte erst 5—10 Minuten in 96%igen Weingeist, dann 4—5 Minuten in 1%ige Kalilauge brachte, und dann nach dem Auswaschen in das Reagens: 12 g Ammonphosphat, 5 g Ammonchlorid, 3 ccm verdünntes Ammoniak[3]), Wasser zu 100 ccm.

Die Kristallformen sind wesentlich von der Menge des Magnesiums abhängig (vgl. Fig. 44). Bei Gegenwart größerer Quantitäten entstehen überwiegend Sterne, deren Strahlen federartig ausgebildet sind. In vielen Fällen sind übrigens die zur Kristallbildung nötigen Phosphormengen im Gewebe zugegen, so daß allein Ammoniakzusatz Bildung von Ammoniummagnesiumphosphat veranlaßt. Die Ammoniakreaktion zeigt neben Phosphaten auch Magnesium an.

[1]) W. Pfeffer, Unters. über d. Proteinkörner u. d. Bedeut. d. Asparagins beim Keimen d. Samen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1872, VIII, S. 429.

[2]) W. Plahl, Über das Vorkommen eines Magnesiumsalzes in der Gewürznelke und seinen Nachweis, Zeitschr. Untersuchg. Nahrgs. u. Genußm., 1921, XLII, S. 246.

[3]) Die Stärke ist in dem Original nicht angegeben.

Die eingehenden kritischen Nachprüfungen der gebräuchlichen Methoden durch O. Richter[1]) haben ergeben, daß der Nachweis als Magnesiumammoniumphosphat immer noch der beste ist, wozu sich auch Natriumammoniumphosphat bei Gegenwart von Ammoniak benutzen läßt. Diese Methode benutzte auch Czapek (Lit. s. Kalium, S. 172, 1) zum Nachweis von Magnesia in den Ausscheidungen der Keimwürzelchen.

Magnesia-Reaktionen erhält man oft in Pollenkörnern (Althaea rosea, Cucurbita pepo), im Inhalte der Siebröhren und in Milchsäften. Hohen Magnesiumgehalt gibt Schimper für die Milchsäfte von Lactuca virosa, Ficus elastica, Euphorbium und Ammoniacum an (Opium und Olibanum geben keine Reaktion), und Molisch[2]) für Euphorbia mammilaris und Galactodendron utile. Wenn wir ferner das harzigölige Sekret der schizogenen Gänge isolieren und durch Ammoniakzusatz stark alkalisch machen, so erhält man teils sofort, teils erst bei nachfolgendem Zusatz von Natriumphosphat typische Magnesiakristalle. Von 26 untersuchten Sekreten (Coniferen, Compositen und Umbelliferen) gaben 9 schon bei Zusatz von Ammoniak, weitere 7 erst bei nachfolgendem Phosphatzusatz Magnesiareaktion. Demnach fehlen Phosphate im Sekret öfters, während Magnesium meist zugegen zu sein scheint (Fig. 44).

Viele moderne Reaktionen auf Magnesium, so die mit Chinalizarin (Ber. deutsch. chem. Ges. 1924, LVII, S. 1394) Titangelb (Biochem. Zeitschr. 1927, CLXXXV, S. 344) und anderen Farbstoffen (Zeitschr. analyt. Chem. 1929, LXXVI, S. 354) o-Oxychinolin (Pharmaz. Ztg., 1929, LXXIV, S. 1364) sind in der pflanzlichen Mikrochemie noch nicht versucht worden.

In Agarabkochungen entstehen Magnesia-Ammoniumphosphate möglicherweise durch die Tätigkeit von Pilzen (Eschbaum[3])) oder durch Austrocknung (Richter[4])).

Zum Nachweis des Magnesiums kann man ferner Schnitte in das Gemisch je eines Tropfens gesättigter Cäsiumchlorid- und Natriumselenitlösung bringen[5]). Es entstehen Kristalle des regulären Systems,

---

[1]) O. Richter, Beiträge zur Kennt. d. Magnesium-Ammonium-Phosphats, Tschermaks mineral. u. petrograph. Mitteil., 1901, XX, S. 89 und: Untersuchungen über das Magnesium in seiner Beziehung zu Pflanzen, Sitzgsber. Wien. Akad., 1902, CXI, 1. Abt., S. 171.

[2]) H. Molisch, Studien über den Milch- und Schleimsaft der Pflanzen, Jena 1910.

[3]) F. Eschbaum, Kristall. Ausscheidungen in Nährböden, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1902, XII, S. 177.

[4]) O. Richter, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1905, XXII, S. 209.

[5]) L. Rosenthaler, Über einen phytomikrochemischen Nachweis des Magnesiums, Mikrochemie, 1930, VIII, S. 151.

vorwiegend Oktaëder. Nickel gibt dieselben Formen (Näheres s. S. 204). Übrigens kann auch das Nickel-Ammoniumphosphat mit der entsprechenden Magnesiumverbindung verwechselt werden. Rißmann[1]) legt die Schnitte in eine ammoniakalische Lösung von Tetraoxyanthrachinon. Bei gröberen Schnitten bildete sich bei Anwesenheit von Magnesium rasch ein blauer Hof, der deutlich von der blauvioletten Lösung zu unterscheiden war.

Zur Prüfung auf „organisch gebundenes" — richtiger nicht ionogenes — Magnesium brüht Klein[2]) die Schnitte (von Blättern, grünen Stengeln und grünen Kotyledonen) in destilliertem Wasser ab und wäscht sie unter mehrmals täglicher Erneuerung des Wassers zwei Tage mit Wasser aus. Sie enthielten dann meist nur Spuren anorganischen Magnesiums. Die gewässerten Schnitte werden feucht auf den Objektträger gebracht und über eine Bromflasche mit weitem Hals gestülpt. Wenn der Schnitt nach mehreren Stunden vollständig mit Brom durchdrungen ist und keine grünen Flecke mehr zeigt, nimmt man den Objektträger ab und läßt entweder das Brom abdunsten oder setzt Ammoniak zu. Man versetzt dann mit einem der Reagentien zur Erzeugung von Magnesiumammoniumphosphat und bringt in die Ammoniakkammer. Es ist fraglich, ob mit diesem Verfahren immer nur „organisch gebundenes" Magnesium angezeigt wird, da auch eine in Wasser schwerlösliche Verbindung wie Magnesiumphosphat durch Brom in Lösung gebracht wird.

Der Gehalt an organisch gebundenem Magnesium ist in etiolierten Pflanzen größer als ihrem geringfügigen Gehalt an Protochlorophyll entspricht (Rißmann).

Eisen

Eisen ist nicht nur für grüne Pflanzen, sondern auch für Pilze unentbehrlich. Wir wissen aber wenig über die Form, in der es in den Zellen auftritt. Es ist bekannt, daß bei Eisenmangel die grünen Pflanzen bleichsüchtig, chlorotisch, werden und daß Zufuhr von Eisen die Chlorose zu heilen vermag. Doch fehlt Eisen dem Chlorophyllfarbstoff. Bei den Eisenbakterien und vielen Algen (Euglenen, Oscillarien, Oedogonien u. a.) sind die Membranen und Gallertscheiden mit Eisenoxydhydrat imprägniert, wodurch die Pflanzen eine gelbe, oft fast schwarze Farbe erhalten, und die rostbraune Färbung des Thallus mancher Flechten rührt von Eisenverbindungen her, die zuweilen in Form kleiner Körnchen den Hyphenmembranen an der Außenseite aufgelagert sind; bei einigen Algen sind Eisenausscheidungen auch im Zellinhalte.

[1]) R. Rißmann, Der Mineralstoffwechsel grüner und etiolierter Pflanzen usw., Planta, 1929, IX, S. 195.

[2]) G. Klein, Der mikrochemische Nachweis von organisch gebundenem Schwefel und Magnesium in der Pflanze, Österr. bot. Zeitschr., 1927, LXXVI, S.15.

Bei Trachelomonas-Arten und Eisenbakterien hängen Art und Ort (siehe S. 201) der endgültigen Fe-Probe (Berlinerblau-Reaktion) sowohl von der Art der Durchführung der Reaktion, als auch von der Gegenwart des lebenden Protoplasten ab (Gicklhorn)[1].

Bei Leptothrix ochracea führt der lebende Protoplast der Zelle große Mengen von Eisenoxyd-Verbindungen. Eisengehalt der Zelle und Eisenspeicherung sind in hohem Maße von einander unabhängig. In toten Zellen ist kein Eisenoxyd mehr nachzuweisen.

Der lebende Protoplast ist der wichtigste und erste Ort der Eisenaufnahme und -speicherung. Der Vorgang der Eisenspeicherung ist als Eisenabscheidung von der Zelle her aufzufassen (Winogradsky).

Je nach den äußeren Verhältnissen können sowohl Eisenoxydul- und Eisenoxyd-Verbindungen, sei es als anorganische oder organische Verbindungen aufgenommen werden.

Im allgemeinen ist der Gehalt an Eisen, den Aschenanalysen zufolge, ein geringer. Wasserpflanzen zeichnen sich durch hohen Gehalt an organischen und anorganischen Eisenverbindungen aus. Abnorm hoher Eisengehalt findet sich in den Fruchtschalen von Trapa natans, stärker in der Zellwand der Desmidiaceen. Durch geeignete Düngung mit Eisen-Karbonat, -Phosphat u. a. kann der Gehalt sehr gesteigert werden, so daß man sogar auf diese Weise gewonnene stark eisenhaltige Drogen (Spinacia, Rumex) als Arzneimittel empfahl. Eisendüngung ist von Einfluß auf die Farbe der Blüten (die Rosafärbung der Hortensien geht bei Zusatz von Ferrichlorid in Blau über). Im Samen und im Holze ist der Eisengehalt gering (selten über 1 %), ebenso in der Rinde; in den Blättern finden sich häufig größere Mengen. In ausgewachsenen Blättern und in älteren Rinden sind meist höhere Werte ermittelt.

Warburg[2]) hat den Eisengehalt verschiedenartiger Zellen bestimmt und pro Gramm Zellsubstanz zehntel bis hundertstel Milligramme Eisen gefunden, in gewissen eisenarmen Samen hundertstel Milligramme.

Zweiwertiges Eisen ist der sauerstoffübertragende Bestandteil des Atmungsfermentes.

Zum Nachweis des Eisens im Gewebe sind nach den kritischen Untersuchungen von Molisch[3]) Tannin, Salizylsäure, Schwefelammon, Rhodankalium[4]) wenig geeignet. Am besten gelingt der Nachweis mit den Blutlaugensalzen. Bei der Herstellung der Präparate müssen eiserne Instrumente nach Möglichkeit vermieden werden. Zum Schneiden benutzt man vorteilhaft Messer mit Klingen aus Messing, Silber oder aus

[1]) J. Gicklhorn, Studien an Eisenorganismen, Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss. Math. naturw. Kl., Abt. I, 1920, CXXIX, S. 187.

[2]) O. Warburg, Über Eisen, den sauerstoffübertragenden Bestandteil des Atmungsfermentes, Biochem. Zeitschr. 1924, CLII, S. 479.

[3]) H. Molisch, Die Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen, Jena 1892.

[4]) Rhodankalium benutzen Weiß und J. Wiesner (Üb. d. direkt. Nachw. d. Eisens in d. Zell. d. Pfl., Sitzber. Wien. Ak., 1860, XL, I. Abt., S. 276).

harter Aluminiumbronze, doch sollen auch bei Verwendung von sehr sauberen Stahlmessern keine Versuchsfehler unterlaufen. An Stelle der Stahlnadeln lassen sich fein ausgezogene Glasstäbe verwenden. Die nicht zu zarten Präparate werden zunächst auf Eisenoxydverbindungen geprüft und gelangen zu diesem Zwecke auf 1—24 Stunden in eine 2proz. wässerige Lösung von gelbem Blutlaugensalz. (Die Dauer der Einwirkung des Ferrocyankaliums richtet sich nach der Dicke der Schnitte.) Darauf werden sie auf dem Objektträger mit 10proz. Salzsäure (frei von Eisen!) versetzt. Es tritt bei Gegenwart einer Eisenoxydverbindung sofort Bildung von Berlinerblau ein. Die Salzsäure ist, sobald sie das Präparat durchdrungen hat, auszuwaschen, denn bei längerer Einwirkung der Säure kann das aus dem Blutlaugensalz stammende Eisen Bildung von Berlinerblau veranlassen. Schließlich ist die Asche zu untersuchen. Ist eine Eisenoxydverbindung nicht zugegen, so muß noch auf Eisenoxydulverbindungen geprüft werden, und zwar in gleicher Weise mit 2proz. Lösung von rotem Blutlaugensalz (Ferricyankalium).

Wiener fand in der Tat, daß in den Kotyledonen von Cruciferen-Samen, besonders des weißen Senfs, die Molisch schon 1892 zur Demonstration von Eisen empfohlen hatte, die die Prokambiumstränge umgebenden Zellen sich wie mit gelbem auch mit rotem Blutlaugensalz blau färben.

(A. Wiener, Beitrag zum mikrochemischen Nachweis des Eisens in der Pflanze, insbesondere des maskierten, Biochem. Zeitschr., 1916, LXXVII, S. 27.)

Einwirkung von HCl-Dämpfen ist zum Nachweis der Lokalisation wässeriger Salzsäure vorzuziehen (Liesegang)[1].

Die Annahme, daß sich mit obiger Reaktion auch „maskiertes Eisen" nachweisen lasse, hat sich nicht bestätigt. Molisch[2]) nahm nämlich in jenen Präparaten maskiertes Eisen an, die erst nach Vorbehandlung mit reinster Kalilauge eine Eisenreaktion gaben. A. Meyer[3]) meinte, daß in jenen Fällen das Eisen aus der benutzten Kalilauge herrühre, doch konnte C. Müller[4]) zeigen, daß Kaliumhydroxyd (in Stangen) stets eisenfrei ist, daß die hergestellten Laugen jedoch aus dem Glase der Aufbewahrungsgefäße Eisen aufnehmen.

---

[1]) R. E. Liesegang, Nachweis geringer Eisen- und Kupfermengen in Leinen, Papier oder tierischen Geweben, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1923, XL, S. 14.

[2]) H. Molisch, Bemerkungen über den Nachweis von maskiertem Eisen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1893, XI, S. 73.

[3]) A. Meyer, Ref. über Molisch: Die Pflanze in ihrer Beziehung zum Eisen, Flora 1892, LXXVI, Ergzbd., S. 292.

[4]) C. Müller, Kritische Unters. über d. Nachweis maskierten Eisens in der Pflanze und den angeblichen Eisengehalt des Kaliumhydroxyds, Ber. deutsch. bot. Ges., 1893, XI, S. 252.

Tunmanns Versuche in Anlehnung an A. Mouneyrat (Bull. commerc. 1906, Nr. 5), das Schwefeleisen mit Ammoniak und Schwefelwasserstoff zu fällen, waren nicht immer befriedigend. Nach Mouneyrat soll sich derart noch 1 μg Eisen nachweisen lassen. Bei dieser Reaktion werden die Schnitte mit Ammoniakwasser (1 : 100, eisenfrei) alkalisch gemacht und danach ½ Stunde lang den Dämpfen von Schwefelwasserstoff ausgesetzt. Bei grünen Pflanzenteilen sind die Färbungen nicht immer genügend klar, die Schnitte werden rasch gelb (infolge von Schwefelausscheidungen).

Macallum[1]) bediente sich beim Nachweis von Eisen im Zentralkörper von Oscillaria Froelichii, Tolypothrix tenuis, Cylindrospermum majus, sowie zum Eisennachweis der Nukleoproteide (s. d.) der gleichen Methode. Das mit Weingeist fixierte Material kommt auf 2—5 Minuten in angesäuerten Weingeist (5 % bei 35° C), wird mit 95proz. Weingeist ausgewaschen und gelangt auf 5 Minuten in eine 1,5proz. Lösung von Ferrocyankalium, die mit 0,5 % Salzsäure versetzt ist. Anderseits benutzte er eine Mischung von Glyzerin und Ammoniumsulfid.

Die mit 70proz. Weingeist fixierten Präparate werden auf dem Objektträger in frisch bereitetes Schwefelammon gebracht. Nach Quincke soll aber ein älteres Schwefelammon wirksamer sein (Über direkte Eisenreaktionen in tierischen Geweben, Arch. exp. Pathol. u. Pharm., 1896, XXXVII, S. 185). Zur Verhütung des Eintrocknens der Präparate wird etwas Glyzerin zugefügt, dann wird mit dem Deckglas bedeckt. Eisenhaltige Zellbestandteile werden grünlich. Nun wird mit Glyzerinwasser ausgewaschen und ein Gemisch von Salzsäure und Kaliumferricyanid zugesetzt (s. oben). Die grünlich gefärbten Teile werden dadurch blau. Auf diese Weise läßt sich nur das in lockerer Bindung anwesende Eisen nachweisen, nicht aber Hämaglobineisen (E. Meyer) u. a. „Eine eisenreiche Verbindung, welche mit Schwefelammon und Ammoniak keine Eisenreaktion gab, erhielt Abderhalden aus Spinat“ (E. Zacharias, Progressus rei bot., 1909, III, S. 127). Nach Marfori (Annal. d. Farmacol., 1898, S. 433) soll die Konzentration des Schwefelammons und auch die Temperatur von Einfluß auf das Gelingen der Reaktion sein. — Zur Unterscheidung von „maskiertem“ und „nicht maskiertem“ Eisen gebrauchte Macallum eine 5proz. Lösung von Hämatoxylin in destilliertem Wasser. „Nicht maskiertes“ Eisen bedingt eine blauschwarze Farbenreaktion. Maskiertes Eisen verändert die bräunlich-gelbe Hämatoxinlösung nicht. Eine Kritik der Methoden von Macallum ist schon von Zacharias (a. a. O.) ge-

[1]) A. B. Macallum, On the cytology of non-nucleated organisms, Trans. Canadian Inst., 1899, VI, S. 439 und Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1892, IX, S. 337.

geben worden. Bei Nachprüfungen, die mit großer Sorgfalt ausgeführt wurden, erhielt Tunmann nur unklare Präparate (Vicia faba, Allium), bei Adiantum war die stärkste Reaktion mit Schwefelammon stets in den Chlorophyllkörnern.

Wiener (l. c. S. 197) prüfte die Methoden Macallums nach, mit denen dieser nach Vorbehandlung mit neutralem oder saurem Weingeist durch Ammonsulfid maskiertes Eisen nachgewiesen zu haben glaubte. Sie kommt zu dem Schluß, daß das nachgewiesene Eisen aus dem Weingeist stammte und daß es zur Zeit ihrer Versuche (1916) noch kein Mittel gab, maskiertes Eisen mikrochemisch nachzuweisen.

Nach Moore (Proc. roy. soc. London, B. 1914, LXXXVII, S. 556) sind die Chloroplasten neben den Zellkernen besonders eisenreich. Behandlung mit spezifischen Assimilationsgiften hat eine Vermehrung des wasserlöslichen Eisens zur Folge. Grießmeyer, der diese Feststellung machte, benutzte das auf Macallum zurückgehende Verfahren Moores, Eisen mit Hämatoxylin in den durch Weingeist entfärbten Chloroplasten nachzuweisen: Kolloides Eisen gibt eine schwarzbraune, ionisiertes, wie bekannt, eine dunkelblauviolette Fällung.

Die sorgfältig gereinigten Blätter wurden in doppelt destilliertem Wasser kurz aufgekocht, stufenweise in absoluten Alkohol übergeführt, durch kurzes Aufkochen entfärbt und stufenweise wieder in Wasser zurückgeführt.

Zur Herstellung des Reagens wurden 0,3 g Hämatoxylin durch Schütteln mit doppelt destilliertem Wasser solange ausgewaschen, bis das Waschwasser keine Spuren von Rotfärbung mehr zeigte. Die dann klar und durchsichtig erscheinenden Kristalle wurden in 50 ccm doppelt destilliertem Wasser gelöst. Die orangegelbe Lösung ist auch bei Aufbewahrung in Jenaer Glas nur einige Tage gebrauchsfähig.

Die Rißpräparate wurden in Glasdosen mit übergreifendem Deckel der Einwirkung des Hämatoxylins ausgesetzt und nach 24 Stunden in einem Tropfen doppelt destillierten Wassers untersucht.

Grießmeyer glaubt die Beteiligung des Eisens an der Photosynthese bewiesen zu haben.

(H. Grießmeyer, Über experimentelle Beeinflussung des Eisens im Chloroplasten, Planta, 1930, XI, S. 331.)

Zum Nachweis von maskiertem Eisen wendet Mawas[1]) folgendes Verfahren an:

[1]) J. Mawas, Nouveau procédé de coloration du fer dans les tissus. Action de l'alizarine monosulfonate de sodium sur le fer inorganique, Compt. rend. soc. biol., 1919, LXXXII, S. 78.

Beizen mit 10proz. Formol oder Bouinscher Flüssigkeit während 24 Stunden. Behandeln mit 2—4proz. weingeistiger Schwefelsäure zur Demaskierung des Eisens. 5—15 Minuten in 5proz. wässerige Lösung von alizarin-monosulfosaurem Natrium. Bad mit Spuren von Kalziumchlorid (bei Überfärbung Differenzieren mit ½proz. weingeistiger Schwefelsäure und Baden in Wasser). Weingeist verschiedener Stärke Xylol, Kanadabalsam; das Eisen wird braunschwarz, die Kerne färben sich violettrot.

Nach Richter[1]), der die Technik des Eisennachweises wesentlich verbessert hat, geht man folgendermaßen vor: a) Eintragen von frischen oder einen Tag in reinem destillierten Wasser in gut gereinigten Glasschalen gequollenen Samen oder von frischen mit Messingmesser aus frischen Kartoffeln, Zwiebeln u. dgl. herausgeschnittenen bis kleinfingerkuppengroßen Gewebestückchen in kleine gut gereinigte Bechergläschen mit reinem Ammoniak; b) Aufkochen über dem Bunsenbrenner durch rund 30 Sek. oder 1 Minute, wobei das Eiweiß nicht gerinnen und die Stärke nicht verkleistern soll; c) zweimaliges Auswaschen mit destilliertem Wasser; d) Übertragen in eine 2proz. Lösung von Kaliumferrocyanid; e) neuerliches zweimaliges Waschen mit destilliertem Wasser; f) Übertragen in 10proz. Salzsäure; g) nach spätestens 10—30 Minuten der Reihe nach Übertragen in Salzsäure, destilliertes Wasser, Glyzerin oder Chloralhydrat, Bedecken mit gut gereinigtem Deckglas, Andrücken desselben, um das Auseinanderweichen der Zellen herbeizuführen und Betrachten im Mikroskop. Dauerpräparate in Glyzerin.

Mit diesem Verfahren fand Richter Eisen unter anderem bei Bohnen in dem protoplasmatischen Inhalt der Gefäßbündelscheide-Zellen, bei Bohnen-Kotyledonen in den Kernen der Grundgewebezellen, bei Rizinussamen in den Zellkernen der Siebteil-Anlagen, bei den Zwiebelschuppen von Allium cepa in den Kernen des Mesophylls und in den Leukoplasten der Gefäßbündelscheiden, bei Kartoffeltrieben in Idioblasten, die sich längs der Gefäßbündel hinziehen, bei Karotten in den Leukoplasten der Gefäßbündelscheidezellen.

In einzelnen Fällen ließ Richter gasförmiges Ammoniak auf die Gegenstände einwirken.

Ziegenspeck[2]) behandelt die Präparate zunächst mit Perhydrol und (einer aus metallischem Natrium selbst hergestellten) Natronlauge (offenbar um maskiertes oder komplexes Eisen zu zerstören),

[1]) O. Richter, Beiträge zur mikrochemischen Eisenprobe, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1922, XXXIX, S. 1.

[2]) H. Ziegenspeck, Über die Rolle des Casparyschen Streifens der Endodermis und analoge Bildungen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1921, XXXIX, S. 302.

wäscht gründlich aus und prüft dann erst mit frischer Kaliumferrocyanidlösung und Salzsäure.

Bei Trachelomonas-Arten und Eisenbakterien tritt Berlinerblaubildung als Reaktion auf Fe_2O_3-Verbindungen in drei Typen auf: a) lokal auf eisenführende Teile des Organismus beschränkt, b) als körneliger oder homogen blauer Niederschlag auch außerhalb der Körperteile, c) in Form Traubescher Zellen verschiedenster Gestalt und Größe an der Körper-, Schalen- und Scheidenoberfläche. Die Art und der Ort der endgültigen Fe-Probe hängt sowohl von der Art der Durchführung der Reaktion als auch von der Gegenwart der lebenden Protoplasten ab (Klebs, Gicklhorn)[1].

Mangan

Trotzdem Mangan zu den für die Pflanze entbehrlichen Stoffen gehört, ist es doch in vielen Pflanzen verbreitet, wie die Befunde der Aschenanalysen zeigen. Es ist ein normaler Bestandteil der Pflanzen (Aso). Im allgemeinen hält sich der Mangangehalt in niederen Grenzen, in Früchten, Samen, Hölzern, Rinden finden sich meist bis 1 % der Asche. Doch kommen höhere Werte vor (Buchen- und Birkenholz 5—15 %). Am meisten Mangan führen die Wasserpflanzen und die Blätter der Landpflanzen (Thea, Strychnos, Sarothamnus scoparius); besonders der Hopfen ist manganbedürftig. Doch schwanken auch hier die Verhältnisse selbst bei sehr nahe verwandten Pflanzen.

Wester[2]) fand auf 100 g getrocknetes Material in Blättern von Digitalis-Arten 1—8 mg, in Blättern von Betula alba 130,4 mg, in Samen 2—67,8 mg, in Blüten 0,92—14,5 mg, in Pilzen 0,6—4,3 mg Mangan. Das Mangan des Bodens wird in den Pflanzen angereichert. Das Verhältnis Mn : Fe ist in der Pflanzenasche viel höher als in Kulturböden. Der Gehalt an Blausäure in Prunus laurocerasus, an Senföl in Senfsamen wird durch Mangandüngung erhöht.

Junge Organe mit intensiven chemischen Umsetzungen sind am reichsten an Mangan; noch mehr findet sich in reifen Samen. Unterirdische Organe enthalten weniger als die oberirdischen; am wenigsten ist im Holz (Bertrand, Rosenblatt)[3]).

Wasserpflanzen enthalten meist mehr Mangan als die Landpflanzen, oberirdische Teile mehr als unterirdische, jungere mehr als ältere. Das meiste Mangan findet sich in den Samen, das wenigste im Stengel (Willmann[4])).

---

[1]) J. Gicklhorn, Studien an Eisenorganismen, Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss. Math. naturw. Kl., Abt. I, 1920, CXXIX, S. 187.

[2]) D. H. Wester, Über das Vorkommen und die Bedeutung von Mangan in Pflanzen, Festschr. f. A. Tschirch (1926), S. 321.

[3]) G. Bertrand u. M. Rosenblatt, Sur la répartition du manganèse dans l'organisme des plantes supérieurs, Compt. rend. acad. sciences, 1921, CLXXIII, S. 1118.

[4]) O. Willmann, Der Mangangehalt offizinelle Drogen liefernder Pflanzen Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1928, XLV, S. 405.

Die Fähigkeit Mangan in der Zellwand zu speichern, findet sich fast allgemein bei den typischen submersen Wasserpflanzen (Molisch, Perušek[1])).

Manganniederschläge wurden von Küster[2]) auf der Oberseite der Blätter von Helodea und Vallisneria beobachtet.

Vom Pilze Craterellus coruncopioides wissen wir durch Garnier (Bull. sciences pharmacol. **36**, S. 140), daß er in 100 g frischen Materials 17,1 mg, in 100 g Asche 127,6 mg Mangan enthält.

Werden Eisenbakterien mit Mangan gefüttert, dann schwellen ihre Scheiden stark an.

Die Bertrandsche Mangantheorie, nach der Oxydasen als Mangan-Eiweißverbindungen aufzufassen sind, hat für die Hederaoxydase keine Gültigkeit (van der Haar[3])).

Über die physiologische Bedeutung des Mangans liegen eine große Anzahl von Angaben vor. Bertrand[4]) fand, daß Spuren von Mangan das Gedeihen der Pflanzen fördern und bezeichnete es als ein katalytisches Düngemittel. Nach Aso[5]) wirkt es stimulierend auf das Wachstum von Reispflanzen, nach Noga[6]) beschleunigt es die Zellteilung und fördert die Chlorophyllbildung; nach Rocasolano[7]) ist es ein Katalysator der biochemischen Reaktionen, mit denen die Pflanzen den Luftstickstoff auf bakteriellem Wege aufnehmen. Auch soll Mangan den Stärke- und Zuckergehalt steigern (Mc. Hargue)[8]).

In eisenchlorotischen Kulturen des Phormidium Retzii var. nigro-violacea beobachtete Boresch auf Zusatz von Mangansalz eine Rückbildung des Chlorophylls und seiner wasserlöslichen Begleitfarbstoffe in derselben Weise wie auf Zusatz von Eisen.

Ein Übermaß von Mangan bewirkt Chlorose, weil Mangan zwar nicht die Aufnahme, aber die Wirkung des Eisens verhindert. Die Chlorose ist durch verstärkte Eisenzufuhr heilbar (Rippel)[9]).

[1]) M. Perušek, Über Manganspeicherung in den Membranen von Wasserpflanzen, Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss. Math. naturw. Kl., Abt. I, 1919, CXXVIII, S. 3.

[2]) E. Küster, Über Manganniederschläge auf photosynthetisch tätigen Pflanzenzellen, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1923, XL, S. 299.

[3]) A. W. van der Haar, Die Entbehrlichkeit des Mangans für das Oxydasenmolekül usw., Biochem. Zeitschr., 1921, CXIII, S. 19.

[4]) G. Bertrand, Vortr. Kongr. angew. Chem., New York, 1912.

[5]) K. Aso, On the universal presence of manganese compounds in plants and their physiological significance, Stocklasa-Festschrift, Berlin, 1928, S. 145.

[6]) Noga, Die Rolle des Mangans im Stoffwechsel der Pflanzen nach Botan. Centralbl. 1929, N. F., XIII, S. 401.

[7]) G. Rocasolano, Das Mangan als Katalysator usw., Int. agrar.-techn. Rdsch., 1916, VII, S. 739, Bot. Centralbl., 1919, XLI, S. 141.

[8]) J. S. Mc. Hargue, Mangan beeinflußt die Zuckerbildung, Jahresber. d. Pharmazie, 1927, LXII, S. 8. K. Boresch, Zur Frage der Ersetzbarkeit des Eisens bei der Chlorose, Ber. deutsch. bot. Ges., 1924, XLII, S. 284.

[9]) A. Rippel, Über die durch Mangan verursachte Eisenchlorose bei grünen Pflanzen, Biochem. Zeitschr., 1923, CXL., S. 315.

In der reinen Mikrochemie stehen zum Mangannachweis verschiedene Reaktionen in Anwendung. Schon Haushofer[1]) fällte aus Lösungen von Manganoxydulsalzen mit Oxalsäure Manganoxalate, die sich beim Eintrocknen der Flüssigkeiten in Form von sternartig gruppierten, farblosen Prismen abscheiden. Sind nur Spuren vorhanden, dann kann man mit Schoorl[2]) die Probe zur Trockne bringen, ein Körnchen Kaliumoxalat zusetzen und durch Anhauchen verflüssigen, wobei man ähnliche Kristallfällungen erhält. Bei dieser Reaktion dürfen aber keine starken anorganischen Säuren zugegen sein, eine schwache Azidität ist förderlich, die Gegenwart von Zink wirkt störend. Ein Zusatz von Kaliumchromat hat sich als zweckmäßig erwiesen. Es scheint ein Doppelsalz von Kaliumchromat mit Mangan zu entstehen (dunkelbraune, doppelbrechende Kristallrosetten). Die Empfindlichkeitsgrenze liegt bei 5 μg (Wagenaar)[3]). Nun hat aber Gössl[4]) gezeigt, daß diese Reaktionen zum Mangannachweis im Pflanzengewebe nicht genügend scharf sind, und empfiehlt Fällung mit Natrium-Ammoniumphosphat bei Gegenwart von Ammoniakdämpfen. Hierbei entstehen nun nicht nur die Tripelphosphate des Mangans, sondern auch die von Eisen, Kobalt, Nickel und Magnesium. Gössl fand aber, daß sich die letzteren sämtlich vom Manganphosphat durch $n/_{10}$ Kaliumpermanganat unterscheiden lassen. Nur die Manganfällungen färben sich hierbei braun. Zudem ist diese Reaktion am empfindlichsten. Noch 0,018 μg Mangan können nachgewiesen werden. Zur Reaktion wird eine verdünnte (0,5 %) Lösung von Natrium-Ammoniumphosphat benutzt. Liegt das Mangan im Gewebe in schwer löslicher Verbindung vor, so werden die Schnitte zunächst in 0,1 proz. Salzsäure gelegt, dann wird Natrium-Ammoniumphosphat zugesetzt und das Präparat über Nacht in Ammoniakdampf belassen.

Zur Manganuntersuchung von Pflanzenaschen benutzt man allgemein die Soda-Salpeterschmelze am Platindraht, die auch bei Gegenwart von Zink eintritt und noch 0,5 μg Mangan anzeigt. Die Oxydationsschmelze zeigt grüne Färbung, die bei Säurezusatz dunkelrot wird (Permanganat). Grüne bis blaugrüne Pflanzenaschen sind manganhaltig, das Manganat wird unter Mitwirkung der Alkalien der Aschen

[1]) K. Haushofer, Mikroskopische Reaktionen, Braunschweig, 1885, S. 96.

[2]) N. Schoorl, Beiträge zur mikroskopischen Analyse; vgl. Emich, Lehrbuch der Mikrochemie.

[3]) A. Wagenaar, Mikrochemische Reaktion auf Mangan, Pharm. Weekbl., 1912, XLIX, Nr. 1.

[4]) J. Gössl, Über das Vorkommen des Mangans in der Pflanze und über ihren Einfluß auf Schimmelpilze, Beih. bot. Centralbl., 1904, XVIII, S. 11.

gebildet. Gewöhnlich liegt Mangan in der Asche als Phosphat vor. Wird die Asche mit Wasser und mit phosphorsäurehaltiger Salpetersäure ausgezogen, dann zeigt ein violetter Rückstand Mangan an.

Sehr empfindlich ist der Mangannachweis mit Benzidin[1]). Man scheidet erst das Mangan durch Ammoniakdampf ab und betupft dann mit einer gesättigten essigsauren Benzidinlösung: Intensive Blaufärbung, die beim Trocknen verschwindet, aber auf erneuten Zusatz von Benzidin wieder erscheint. In der Pflanzenmikrochemie ist die Reaktion noch nicht verwendet worden.

Nickel

Nickel ist nach Martini[2]) ein regelmäßiger Pflanzenbestandteil und vielleicht „ein für das Pflanzenleben unerläßliches Element."

Zum mikrochemischen Nachweis läßt Martini die Schnitte auf dem Objektträger in einen Tropfen einer gesättigten Cäsiumchloridlösung bringen und dann einen Tropfen einer gesättigten Natriumselenitlösung zusetzen. Es entstehen alsbald die Kristalle — meist Oktaëder — des Cäsium-Nickelselenits $Cs_2 [Ni(SeO_3)_2]$.

Zur Kontrolle gibt Martini in einem zweiten Versuch unmittelbar nach den genannten Reagentien einen Tropfen einer gesättigten wässerigen Lösung von Dimethylglyoxim hinzu, erhitzt den Objektträger über der Flamme eines Spiritusbrenners bis zum beginnenden Kochen und beobachtet nach dem Erkalten. Bei Gegenwart von Nickel erscheinen — vor allem nahe den Rändern des Deckglases — isoliert oder in Bündeln die roten Nadeln des Nickel-Dimethylglyoxims.

Da die Martinische Reaktion, wie die Nachprüfung ergab, auch mit Magnesiumverbindungen (s. S. 195) eintritt, so sind die Angaben Martinis über die Verbreitung des Nickels als unbewiesen zu betrachten, um so mehr, als auch Eisen(2)salze mit Dimethylglyoxim eine rote Färbung geben. Nach eigenen Untersuchungen[3]) kommt Nickel übrigens nicht selten in Pflanzen vor, aber wohl kaum in so großer Menge, daß die Martinische Reaktion in den Zellen eintritt.

Bertraud u. Mokragnatz fanden in Pilzen am meisten Nickel. Der Gehalt an Kobalt steigt und sinkt mit dem des Nickels (Cpt. rend. Acad. sciences Paris, 1930, CXC, S. 21).

[1]) F. Feigl u. R. Stern, Über die Verwendung von Tüpfelreaktionen in der qualitativen Analyse, Zeitschr. anal. Chem., 1921, LX, S. 24.

[2]) A. Martini, Der phytomikrochemische Nachweis des Nickels und sein Vorkommen im Pflanzenreich, Mikrochemie 1930, VIII, S. 41.

[3]) L. Rosenthaler, Über den Nachweis von Nickel in Drogen, Pharmazeut. Zentralh., 1930, LXIII, S. 241.

Zink

Ist im Pflanzenreich weit verbreitet (Javillier, Bertrand, Keilholz, Montanari u. a.). Zink ist für die Zwergsonnenblume, Gerste, Mais und möglicherweise noch für viele andere, höhere, grüne Pflanzen zum Wachstum nötig (Sommer u. Lipman)[1]).

Pflanzenmikrochemisches nicht bekannt.

Aluminium

Das Aluminium ist im Pflanzenreich weit verbreitet und manche Pflanzen enthalten soviel Aluminium, daß man sie geradezu als Al-Pflanzen bezeichnen kann. Dazu gehören nicht nur Lycopodium-Arten, von denen dies seit langem bekannt ist, sondern andere Farne, auch manche Algen, Taxus baccata, Ephedra helvetica und auch viele Angiospermen. Blüten können Al enthalten, auch wenn die zugehörigen Blätter und Stengel daran arm sind. Manche Kryptogamen speichern Al besonders in den Sporophyllständen oder den fertilen Blattabschnitten (Kratzmann[2])).

Die Xerophyten besitzen nur einen geringen Gehalt an Aluminium, in Blüten und Samen der Phanerogamen höchstens Spuren; die Hydrophyten und Hygrophilen (unter den Algen in erster Linie die Characeen) zeichnen sich durch einen großen Aluminiumgehalt aus. Der oberirdische Teil der höher organisierten Pflanzen enthält immer weniger Aluminium als der unterirdische. Bei den Samen der Hydrophyten und Hygrophilen wird auch Aluminium aufgespeichert (Stocklasa[3])).

Besonders reich an Aluminium ist Orites excelsa R. Br. (36 bis fast 80 % Tonerde in der Asche), in deren Holz basisch bernsteinsaures Aluminium abgelagert sein soll.

Düngung mit Kalialaun oder Aluminiumsulfat fördert die Bildung blauer Blüten durch vermehrte Bildung blauer Anthocyane aus roten (Molisch).

Aluminium, in sehr geringer Menge aufgenommen, besitzt die Fähigkeit, die Giftwirkung des Eisens- und Mangans herabzusetzen oder aufzuheben (Stocklasa[4])). Die Härte der Fruchtwand von Symplocos lanceolata dürfte auf die Einlagerungen von Tonerde zurückzuführen sein. Symplocos-Arten, die Tonerdekugeln führen, gedeihen nur, wenn sie Aluminium aufnehmen können (Neger[5])).

[1]) A. L. Sommer u. C. B. Lipman, Evidence on the indispensable nature of zinc and boron for higher green plants. Plant physiology, 1926, I, S. 231 nach Bot. Centralbl., 1927, N. F., XI, S. 331.

[2]) E. Kratzmann, Der mikrochemische Nachweis und die Verbreitung des Aluminiums im Pflanzenreich, Pharmaz. Post, 1914, XLVII, S. 101, auch Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss., Math. naturw. Kl. Abt. 1, 1913, XXII, S. 311.

[3]) J. Stocklasa, Über die Verbreitung des Aluminium-Ions in der Pflanzenwelt, Biochem. Zeitschr., 1918, LXXXVIII, S. 292.

[4]) J. Stocklasa, Über die Verbreitung des Aluminiums in der Natur, Jena, 1922.

[5]) F. W. Neger, Die Tonerdekörper in den Blättern von Symplocos-Arten, Flora, 1923, N. F., S. 326.

Aluminium hebt die Plasmolysierbarkeit der Zellen auf (Fluri[1]), weil die Al-Ionen eine Erstarrung des Protoplasmas bewirken (Szües[2]).

Lepeschkin führt die starke Wirkung, die Aluminiumsalze auf das Protoplasma ausüben, auf deren starke H-Ionen-Konzentration zurück.

Geringe Mengen von Aluminium wirken stimulierend, größere giftig. (Mac Lean and B. E. Gilbert, Aluminium toxicity, Plant Physiology 1928, III, S. 293.)

Mc. Callum, Rask u. Becker (Journ. biol. Chem., 1928, LXXVII, S. 753) betrachten die Rolle des Aluminiums als noch völlig ungeklärt; es ist kein Bestandteil der lebenden Substanz.

Vgl. dazu noch L. Kahlenberg und J. O. Closs, Das Vorhandensein von Aluminium in tierischem und pflanzlichem Material, Journ. biol. chem., 1930, LXXXV, S. 783.

In Symplocosarten hat Radlkofer[3]) Tonerdekörper aufgefunden, so in den Palisaden und im Rindenparenchym von Symplocos lanceolata (Mart.) A. DC., dem Alaunbaum von Rumphius. Sie lösen sich allmählich in Schwefelsäure, auch in frisch bereiteter Javellescher Lauge und färben sich intensiv rot mit Alizarin und Brasilin (in 70proz. Weingeist), selbst nach Vorbehandlung der Präparate mit 0,5proz. Ammoniaklösung. Der Radlkofersche Nachweis ist nur bei hohem Al-Gehalt brauchbar und nicht eindeutig (Kratzmann). Über ihre Natur gibt deshalb besser die Aschenanalyse Aufschluß. Die Blattasche enthält fast 50 % Tonerde.

Zum Nachweis kleiner Mengen von Alaun in Mehl und Brot benutzte Blyth[4]) Campecheextrakt. Er ließ in den kalt bereiteten wässerigen Auszügen dieser Nahrungsmittel einen Gelatinestreifen quellen und färbte diesen mit Campecheholz, Blaufärbung zeigt Alaun an. Lenz[5]) gebrauchte ebenfalls diese Methode, indem er Hämatoxylinlösung (1proz. Lösung in Weingeist von 50 Gewichtsprozenten) anwandte. Zusatz von Hämatoxylin zu einer alaunhaltigen Flüssigkeit färbt diese intensiv blau, „während von Tonerde freie Flüssigkeiten nur eine nach Violett spielende Rotfärbung zeigen". Diese Reaktion, die zum Nachweis von Aluminium in der Asche brauchbar ist, wird

[1]) M. Fluri, Der Einfluß von Aluminiumsalzen auf das Protoplasma, Flora, 1909, XCIX, S. 81.

[2]) J. Szües, Über einige charakteristische Wirkungen des Aluminium-Ions auf das Protoplasma, Jahrbücher f. wiss. Bot., 1913, LII, S. 269.

[3]) L. Radlkofer, Über Tonerdekörper in den Pflanzenzellen, Ber. Deutsch. Bot. Ges., *1904*, *XXII*, *S. 216*.

[4]) W. Blyth, The Analyst, 1880, VII, S. 16.

[5]) W. Lenz, Nachweis von Alaun in Mehl und Brot, Apoth. Ztg., 1911, XXVI, S. 687.

sich wahrscheinlich auch für Gewebe benutzen lassen; sie ist empfindlicher als die Reaktion von Streng mit Kaliumbisulfat. Mit Kaliumbisulfat scheiden sich flache Oktaëder von Kaliumalaun ab, die ziemlich leicht löslich und oft anisotrop sind. H. Behrens hat 1881 Cäsiumchlorid als Reagens eingeführt. Zur Alaunlösung, die etwas freie Schwefelsäure enthalten soll, wird ein Körnchen Cäsiumchlorid gebracht. Es gelangen farblose, tafelförmige Oktaëder von schwer löslichem Cäsiumalaun zur Abscheidung. Nach Schoorl[1]) eignet sich am besten Cäsiumchlorid, welches durch Spuren von Cäsiumalaun (als Impfsubstanz, verunreinigt ist (1,0 Cäsiumalaun in 1000000,0 Cäsiumchlorid)[2]).

Kratzmann verwendet ebenfalls die Cäsium-Alaun-Reaktion und bedient sich dazu einer Mischung gleicher Teile einer 2-mol. Lösung von $CsCl_2$ und einer 8-mol. Schwefelsäure (die erste 33,63proz., die zweite 39,2proz.). Zum Nachweis des Al in Pflanzenasche bringt man diese in einen nicht zu kleinen Tropfen des Reagens, worauf der Alaun sofort oder erst nach einiger Zeit auftritt. Erfolgt die Einwirkung unter starkem Aufbrausen, ist also voraussichtlich viel Kalziumkarbonat zugegen, so muß man genügend verdünnte Schwefelsäure zusetzen, um das Kalzium zu binden. Auch bei Schnitten läßt sich das Reagens verwenden, doch nicht zu Lokalisationsstudien.

Von anderen Aluminiumreaktionen seien noch genannt die mit einer weingeistigen Lösung von Morin eintretende gelbgrüne Fluoreszenz und die mit Farbstoffen eintretenden gefärbten Niederschläge. Näheres über letztere Reaktionen s. E. Eegriwe, Beiträge zum Nachweis von Aluminium mittels Farbstoffreagentien. Zeitschr. analyt. Chem., 1929, LXXVI, S. 438.

Kupfer

Da Kupferverbindungen im Boden häufig vorkommen, so sind die zahlreichen Befunde über die Anwesenheit von Kupfer in den Pflanzen erklärlich (Capsicum, Taraxacum, Vicia faba, Zea mays, Quercus, Odyendea gabunensis, Strychnos nux vomica u. a., s. auch Czapek, Biochemie). Kupfer tritt besonders in Samen und Wurzeln, aber auch in den Blättern, im Stengel und Stamm auf. In Pflanzen, die auf stark kupferhaltigem Boden wachsen, soll sich Kupfer in metallischer Form in den Gefäßen und Holzelementen vorfinden (Mac Dougal). Das bisher Ermittelte über Lokalisation fußt auf makrochemischen Arbeiten. Über die

[1]) N. Schoorl, Chem. Weekbl., 1911, VIII, S. 268; Zeitschr. f. analyt. Chem., 1911, S. 266.

[2]) Das gegenwärtig im Handel befindliche Cäsiumchlorid ist frei von Tonerde, das Reagens muß erst geimpft werden (W. Lenz, Briefl. Mitt.).

Art der Bindung des Kupfers in der Zelle sind wir nicht unterrichtet (Lehmann hat Kupfereiweißverbindungen angenommen).

Eisen-Kupfer- und Mangangehalt einiger pflanzlicher Nahrungsmittel R. E. Remington und H. E. Shiver, Journ. Assoc. offic. agricult. chem., 1930, XIII, S. 129; Chem. Zentralbl., 1930, I, S. 2813.

Vgl. ferner: A. Quartaroli, Über das Kupfer als ein für die Pflanzen notwendiges Element, Annali chim. appl., 1929, XIX, S. 467; Chem. Zentralbl., 1930, II, S. 75.

Über den Nachweis in Geweben oder mit Schnitten liegen keine Angaben vor. Zum Studium wird es sich empfehlen, Pflanzen auf stark kupferhaltigen Böden zu ziehen. Über die Gegenwart von Kupfer wird man sich zuvor durch einige makrochemische Prüfungen unterrichten (Flammenreaktion, Lötrohrversuche, Aloinreaktion u. a.). Endospermschnitte von Strychnos nux vomica (frisches Material aus dem botanischen Garten in Saigon) gaben mit Ammoniak Blaufärbung. Mehrere große Schnitte kamen in einen ausgehöhlten Objektträger in einen großen Tropfen Ammoniak, das Deckglas wurde luftdicht verschlossen. Zunächst entstanden die Alkaloidfällungen und nach 5 bis 8 Stunden ließ sich beim Halten der Objektträger über eine weiße Unterlage eine Blaufärbung feststellen. An Handelsmaterial gelang die Reaktion nicht und bei den geprüften 9 frischen Samen trat nur 4mal eine kräftige Färbung ein. Für sich allein ist die Reaktion nicht beweisend, auch wenn sie, wie im vorliegenden Falle, mit Ammoniumkarbonat ebenfalls eintritt. Ob der Nachweis von Kupfer nach Bradley[1]) mittels Blauholzhämatoxylin (Blaufärbung), der noch bei 1 : 1000000000 gelingen soll, auch bei Geweben erbracht werden kann, muß erst erprobt werden, würde aber gleichfalls die nötige Kritik erfordern (Aluminium, S. 206). Besser wäre, weil kristallinische Produkte gebend, Cäsiumchlorid[2]). Dieses gibt mit Kupferverbindungen in salzsaurer Lösung gelbe oder rote, nadelförmige oder prismatische Kristalle. Die Reaktion gelingt noch mit 0,1 μg. (Weitere Reaktionen bei Behrens, Anleit. und Emich, Lehrbuch der Mikrochemie.)

Die modernen Reaktionen auf Kupfer z. B. die Fällung mit Benzoinoxim (Feigl) oder die als Kupferquecksilberrhodanid bei gleichzeitiger Anwesenheit von Zink (Montequi) sind in der Pflanzenmikrochemie noch nicht verwendet worden.

[1]) H. C. Bradley, *Eine empfindliche Kupferreaktion und eine mikrochemische Probe auf Zink*, Amer. Journ. of Sc., Ref. Chem. Centralbl., 1906, II, S. 1873.

[2]) P. A. Meerburg u. H. Filippo, Chem. Weekbl., 1905, II, S. 461, Südd. Ap. Ztg., 1905, XLV, S. 835.

Blei

Blei aus Pb-haltigen Kulturlösungen wird bei Wurzeln von Allium cepa, Zea mais und Vicia faba in besonders hoher Konzentration im Kern und den Zellwänden gebunden.

Nachweis durch Behandlung mit Natriumsulfidlösung steigender Konzentration[1]).

II. Organischer Teil

1. Acyclische Stoffe

Dulcit, Mannit, Sorbit

Die sechswertigen Alkohole Mannit, Dulcit, Sorbit finden sich häufig in Pflanzen. Mannit läßt sich leicht aus der Handelsmanna herstellen. Er scheidet sich aus der mit siedendem Weingeist bereiteten Mannalösung beim Erkalten kristallinisch aus. Aus Weingeist fällt er in feinen seidenglänzenden Nadeln, aus Wasser in farblosen Prismen. Mannit löst sich leicht in heißem Wasser und Weingeist, schwerer in kaltem Wasser; unter Deckglas kann er mit kaltem Weingeist umkristallisiert werden (Fig. 45). Fehlingsche Lösung wird bei kurzem Kochen nicht reduziert. Mannit kommt zu 30—60 % in der Handelsmanna vor (hier ist

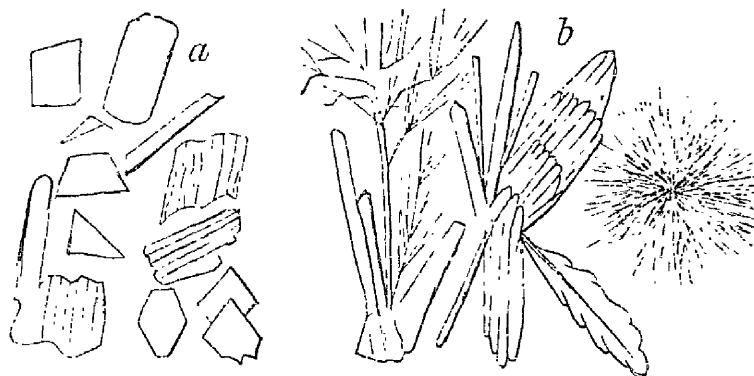



Fig. 45. *a*) Splitter reiner Manna (Droge, in Tränen), in Wasser liegend, beim Beginn der Lösung; *b*) Mannitkristalle mit Alkohol aus der Droge erhalten. Die gleichen Kristallformen erhält man bei der direkten Sublimation der Droge (Tunmann)

die abnorme Menge eine Folge der Verwundung von Fraxinus ornus), ferner in Laminaria flexicaulis, L. digitata, L. saccharina (5—12 %), in Pilzen (Mutterkorn, Lactarius-, Agaricus-, Elaphomyces-Arten), im Spargel, im ausgeschwitzten Safte mancher Fichten, Linden und Obstbäume, in Blättern (Syringa vulgaris, Ligustrum vulgare, Jasmin-Arten, Olea europaea, Linaria, Apium graveolens), in Rinden (Canella alba, Phillyrea latifolia, Fraxinus excelsior, Warburgia Stuhlmannia, Platanus orientalis, Genipa brasiliensis, Basanacantha spinosa, Lawsonia inermis) in Wurzeln (Scorzonera hispanica, Daucus carota, Triticum repens, Punica granatum, Apium graveolens, Aconitum napellus, Meum athamanticum, Polypodium

[1]) F. S. Hammett, Die Lokalisierung von Blei in der Zelle der wachsenden Wurzel, Protoplasma, 1928, V, S. 135.

vulgare, Glycyrrhiza glabra), den Knollen von Ipomoea purga, in Früchten (Coffea arabica, Opuntia vulgaris, Prunus laurocerasus, Laurus persea).

Dulcit scheidet sich aus der wässerigen Lösung der Madagaskar-Manna in monoklinen prismatischen Kristallen ab, die in kaltem Wasser schwerer als Mannit löslich sind. Dulcit findet sich in Melampyrum pratense, M. nemorosum, Scrophularia nodosa, Evonymus europaea, E. atropurpurea, E. japonica, hauptsächlich in Scrophulariaceen und Celastraceen. Bei Scrophulariaceen hat Monteverde Vorkommen oder Fehlen von Mannit und Dulcit als Gruppenmerkmal benutzt.

Der isomere Sorbit ist nur in Früchten der Pomaceen und Prunaceen gefunden worden, wird aus den Früchten von Sorbus aucuparia dargestellt und bildet kleine farblose Kristalle, die sich leicht in Wasser, schwer in Weingeist lösen.

In physiologischer Hinsicht können die Zuckeralkohole die Glykose vertreten. Stärkebildung aus Mannit und Dulcit hat 1885 A. Meyer und aus Sorbit in neuerer Zeit Treboux nachgewiesen. Der Mannit in den Früchten von Olea europaea soll nach Gerber und de Luca der Ölbildung dienen. Hartwich und Uhlmann

Fig. 46. Mannitkristalle aus Fraxinus ornus, aus Schnitten mit Alkohol im Hängetropfen erhalten (Tunmann)

konnten nur Spuren von Mannit nachweisen und geben Glykose als Ausgangsmaterial der Ölbildung bei Olea an.

Für Sterigmatocystis nigra und Apium graveolens gibt Obaton[1]) an, daß der Mannit als Reservekohlenhydrat zu betrachten sei. Über weitere Vorkommen von Dulcit, Mannit und Sorbit s. Abderhaldens Biochemisches Handlexikon, Bd. VIII, S. 237, 238, 242.

Mannit ist ein allgemeiner Bestandteil der Braunalgen.

Zum Nachweis der Zuckeralkohole ist es empfehlenswert, lebende Pflanzen benutzen zu können. Geeignete Objekte zum Nachweis von Mannit sind Blätter von Olea europaea und Fraxinus ornus, für den Nachweis von Dulcit junge Triebe von Evonymus-Arten. Sorbit läßt sich in den roten (nicht grünen) Früchten von Sorbus aucuparia nachweisen. Zum Nachweis von Dulcit brachte Borodin[2]) die Schnitte auf dem Objektträger in einen oder doch nur wenige Tropfen Weingeist,

[1]) F. Obaton, Ursprung und Kreislauf des Mannits in den Pflanzen, Compt. rend. Acad. sciences, 1929, CLXXXVIII, S. 79.

[2]) Borodin, Über die mikrochemische Nachweisung und die Verbreitung des Dulcits im Pflanzenreiche, Ref. Bot. Zentralbl., 1890, XLIII, S. 175.

legte das Deckglas auf und ließ langsam eintrocknen. Dulcit scheidet sich in Form von unregelmäßigen tafelförmigen oder prismatischen Kristallen aus. In gleicher Weise wies Monteverde[1]) Mannit nach, der in feinen, glänzenden Nadeln auskristallisiert. Der Sorbitnachweis gelang Tunmann derart nicht. Nun scheiden sich aus Weingeist nicht nur die Zuckeralkohole aus, sondern auch Kristalle von Salpeter, die mit Diphenylamin-Schwefelsäure leicht zu erkennen sind, ferner andere anorganische Salze, Asparagin (s. d.) u. a. Somit ist die Ausführung der Borodinschen Probe unbedingt erforderlich. Mannitkristalle wachsen und vermehren sich bei Zusatz einer völlig gesättigten, wässerigen Lösung von Mannit, während Dulcitkristalle langsam gelöst werden. Letztere wachsen andererseits bei Zusatz ihrer Lösungen, während die übrigen wasserlöslichen Ausscheidungen gelöst werden.

Sind nur geringe Mengen zugegen oder arbeitet man mit 1 bis 2 Schnitten, dann sorge man für möglichst langsame Verdunstung, indem man mehr Weingeist anwendet, das Deckglas nach einiger Zeit abhebt und den Objektträger umlegt, so daß der Rest des Weingeists (als Hängetropfen) langsam verdunstet. Überwiegend entstehen die Kristalle erst nach 12—24 Stunden; sie finden sich fast stets am Deckglasrande zu baum- und strauchartigen Gruppen vereint (Fig. 46). Bessere Erfolge wie mit kaltem Weingeist hat Tunmann bei verschiedenen Objekten erhalten (Olea europaea, Fraxinus ornus)[2]), wenn die Schnitte in Weingeist aufgekocht wurden. Man kann auch einige Schnitte auf dem Objektträger in einigen Tropfen Wasser aufkochen, bis nur eine Spur Flüssigkeit zurückbleibt, dann das Deckglas auflegen und dem noch heißen Objekte Weingeist zufügen. Auch hierbei scheiden sich nach dem Verdunsten die Kristalle am Deckglasrande ab. Bei Behandlung mit heißem Weingeist ist nach dem Eindunsten die Kristallschicht am Deckglasrande oft makroskopisch sichtbar (Rindenparenchym von Evonymus europaea). Beim Versagen der Reaktion mit Schnitten muß ein größeres Pflanzenstück fein zerschnitten und im Reagenzglase mit Weingeist ausgekocht werden. Der weingeistige Auszug wird im Uhrglase eingedunstet und sein Rückstand untersucht.

Beim Mannitnachweis leistet die Sublimation brauchbare Dienste[3]). Bei der Handelsmanna erhält man ein Sublimat aus reinen

[1]) N. A. Monteverde, Über die Verbreitung des Mannits und Dulcits, Ann. agr., 1893, XIX, S. 444, Sep.

[2]) Im Blatte von Fraxinus ornus war im Monat Juli stets mehr Mannit zugegen als im Blatte von Olea europaea.

[3]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie und Mikrosublimation einiger Methanderivate, Apoth. Ztg., 1912, XXVII, S. 971.

Mannitkristallen (Fig. 45b). Bei pflanzlichen Objekten zieht man einige Schnitte auf dem Objektträger mit Weingeist aus, läßt den Auszug, nachdem die Schnitte beiseite geschoben wurden, eindunsten und sublimiert den Rückstand. Das Sublimat besteht dann fast ausschließlich aus Mannit. Der Sorbitnachweis ist am schwierigsten (Sorbit gibt kein brauchbares Sublimat). Er gelingt nur mit heißem Weingeist oder Wasser einigermaßen; es ist ratsam, den Objektträger eine Woche in den Exsikkator zu legen. Zum Aufsuchen der Sorbitausscheidungen ist polarisiertes Licht heranzuziehen. Vielfach findet man den Sorbit in sphärokristallinischen Gebilden, die bei gekreuzten Nikols ein dunkles Kreuz zeigen und später moosartige Figuren bilden. Übrigens kristallisiert reiner Sorbit ebenfalls am Objektträger nur schwierig. Zuweilen (nicht immer) gelingt der Nachweis mit Benzaldehyd. Nicht zu dünne Schnitte von Sorbus (frische rote Früchte) werden mit verdünnter Schwefelsäure (1 : 10) befeuchtet und in Benzaldehyd eingelegt. — Der Nachweis der Zuckeralkohole in der Zelle gelingt nur selten.

Formaldehyd

Nach der Hypothese von Baeyer sollen die Pflanzen bei der Assimilation die Kohlensäure mit Hilfe des Chlorophylls zu Formaldehyd reduzieren; dieser wird dann weiter zu Kohlenhydraten kondensiert. Der Nachweis von Formaldehyd ist daher von großer Bedeutung. Reinke und Braumüller beschäftigten sich mit dieser Frage schon 1899, dann nahm Curtius das Studium auf und hat mit Franzen[1]) aus Blättern von Carpinus betulus Formaldehyd gewonnen (1 kg = 0,8613 mg). Nach Nizza[2]) soll ferner freier Formaldehyd, der kein Produkt der Assimilation ist, im Holze vorkommen. M. Kleinstück hat ihn im Kambialsaft der Koniferen gefunden (Ber. deutsch. chem. Ges., 1912, XLV, S. 2902).

Um den bei der Assimilation entstehenden Formaldehyd abzufangen haben Klein und seine Mitarbeiter zuerst das von Vorländer entdeckte Aldehydreagens Dimethylhydroresorzin (Dimedon, Methon) und später Harnstoff benützt. Dimethylhydroresorzin gibt noch mit einer 0,00005proz. Formaldehydlösung nach 4—6stündigem Stehen eine deutliche Trübung[3]).

Über die Eigenschaften der Aldehydverbindungen des Dimethylhydroresorzins s. D. Vorländer, Ztschr. f. analyt. Chem. 1929, LXXVII, S. 241 und G. Klein und H. Linser, Pregl-Festschrift 1929, S. 204.

[1]) Th. Curtius u. H. Franzen, Aldehyd aus grünen Pflanzenteilen, Sitzgsber. Heidelberger Ak., 1910, XIII und: Das Vorkommen von Formaldehyd in den Pflanzen, Ber. chem. Ges., 1912, XLV, S. 1715.

[2]) S. Nizza, Il problema dell'aldeide formioa nelle piante, Malp., 1906.

[3]) G. Klein u. O. Werner, Formaldehyd als Zwischenprodukt bei der Kohlensäure-Assimilation, Biochem. Zeitschr., 1926, CLXVIII, S. 361.

Brunswik hat berechnet, daß ein mikrochemischer Nachweis des Formaldehyds im Chlorophyllkorn unmöglich ist. Es ist deshalb schade, daß die im folgenden angegebene Methode von Kimpflin von allen neueren Forschern übersehen und nicht nachgeprüft worden ist.

Kimpflin[1]) benutzte zum Nachweis im Gewebe eine konzentrierte Natriumbisulfitlösung, die mit Methyl-p-amino-m-Kresol im Überschuß versetzt ist. Das Reagens wird in ein langes Rohr gebracht, dessen Ende umgebogen und in eine feine kapillare Spitze ausgezogen ist. Die Spitze wird in das Gewebe eingeführt (Agave mexicana). Die Einwirkung währt im Sonnenlichte einige Stunden. Dann wird der imprägnierte Teil abgeschnitten und in absoluten Alkohol gelegt. Der rote Niederschlag in vielen Parenchymzellen zeigt Formaldehyd an.

Azetaldehyd

Kleine Mengen von Azetaldehyd sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Nachdem zunächst sein Vorkommen in verschiedenen ätherischen Ölen festgestellt war, fanden ihn Curtius und Franzen im Destillat mehrerer Blätter. Griebel[2]) fand ihn in vielen Früchten, auch in Wurzeln, oberirdischen vegetativen Teilen, Blüten und auch in zwei Pilzen, nachdem ihn schon vorher Müller-Thurgau und Osterwalder in Birnen festgestellt hatten.

Das Vorkommen von Azetaldehyd hängt damit zusammen, daß er beim Abbau von Kohlenhydraten als Zwischenprodukt auftritt, wie dies zuerst Neuberg für die Hefegärung und andere Gärungsvorgänge bewiesen hat.

Keimfähige Samen der Gramineen und Leguminosen unterscheiden sich durch einen Gehalt an Azetaldehyd von den nichtkeimfähigen (Niethammer)[3]).

Kostyschew konnte die Bildung von Azetaldehyd bei der anaeroben Atmung von Pappelblüten feststellen (Zeitschr. physiol. Chem., 1913, LXXXIII, S. 105).

Klein und Werner fanden, daß alle stark atmenden Pflanzenorgane sowohl bei aeroben als anaeroben Bedingungen Azetaldehyd erzeugen.

Azetaldehyd ist eine bei 20,8° siedende mit Wasser, Weingeist und Äther mischbare Flüssigkeit.

Für den mikrochemischen Nachweis sind wichtig:

Das p-Nitrophenylhydrazon. Goldgelbe, meist mehr oder weniger gebogene Nadeln mit schräg abgeschnittenen Enden. F. 128,5°.

o-Nitrophenylhydrazon. Goldgelbe Kristallnadeln.

[1]) P. Kimpflin, Über die Gegenwart von Methanal (Formaldehyd) in grünen Pflanzen, Compt. rend., 1907, CXLV, S. 148.

[2]) C. Griebel, Mikrochemischer Nachweis von Azetaldehyd in Früchten, Zeitschr. Unters. Nahrgs. u. Genußm., 1924, XLVII, S. 438; Azetaldehyd, ein normaler Bestandteil der als „Inklusen" bezeichneten gerbstoffreichen Zelleinschlüsse im Mesokarp bestimmter Früchte, ebenda 1924, XLVIII, S. 218.

[3]) A. Niethammer, Azetaldehydbestimmungen mit Hilfe des Griebelschen Mikrobecherchens, Mikrochemie, 1929, VII, S. 227.

Azetaldimethon[1]), Quadratische und rechteckige Kristalle F. 139°.

Zum Nachweis des Azetaldehyds nach Griebel[2]) bringt man die zu untersuchende Substanz (0,03—0,5 ccm Lösung, entsprechende Mengen fester oder breiiger Substanzen, feste Stoffe mit einigen Tropfen Wasser) in kleine oben glatt abgeschnittene und etwas plangeschliffene Becherchen aus Jenaer Glas (10—25 mm hoch, 10—15 mm lichte Weite) und bedeckt sie sofort nach dem Hineinbringen des Untersuchungsmaterials mit einem Deckgläschen, das nach leichtem Einfetten kurz zuvor auf der nach unten zu kehrenden Seite mit Hilfe eines dünnen Glasstäbchens mit einem Reagenztropfen[3]) versehen worden war[4]). Das Tröpfchen soll in der Regel annähernd 2 mm Durchmesser haben und mindestens 3 mm über dem Untersuchungsmaterial hängen. Am besten erwärmt man dann das Becherchen, indem man es auf ein schwach geheiztes und mit Tonplatten bedecktes Wasserbad stellt. Sobald sich kristallinische Ausscheidungen im hängenden Tropfen gebildet oder am Deckgläschen zahlreiche kleine Wassertröpfchen gebildet haben, stellt man das Becherchen zum Abkühlen beiseite und durchmustert das Deckgläschen nach dem Erkalten, nachdem man es mit dem Tropfen nach unten auf einen hohlgeschliffenen Objektträger gelegt, dessen Ausschliff vorher mit einem Vaselinring umgeben wurde, und leicht angedrückt hatte.

Die erste Abfangung von Azetaldehyd gelang Neuberg, Färber und Reinfurth mit sekundären Sulfiten, später auch mit Dimethylhydroresorzin, Semikarbazid und Thiosemikarbazid.

Klein u. Fuchs benutzten Benzhydrazid und Phenylessigsäurehydrazid. Mit diesen Verfahren wurde von Klein[5]), Bodnár[6]), Neuberg[7]) und seinen Mitarbeitern Azetaldehyd in niederen und höheren Pflanzen gefunden.

Klein u. Pirschle wandten sowohl Sulfite als Dimethylhydroresorzin an.

---

[1]) G. Klein u. H. Linser, Zur Charakteristik und Analytik der Aldehydmethonverbindungen, Pregl-Festschrift, 1929, S. 204.

[2]) C. Griebel, Zum Vorkommen von Azetaldehyd in Früchten und anderen Pflanzenteilen, Zeitschr. Unters. Nahrgs. u. Genußm. 1925, XLIX, S. 105.

[3]) C. Griebel u. F. Weiß, Über den mikrochemischen Nachweis flüchtiger Aldehyde und Ketone, Mikrochemie, 1927, V, S. 146.

[4]) Von den Nitrophenylhydrazinen verwendet man gesättigte Lösungen in 15proz. Essigsäure.

[5]) G. Klein, Naturwissenschaften, 1925, XIII, S. 21.— G. Klein u. K. Pirschle, Azetaldehyd als Zwischenprodukt der Pflanzenatmung, Biochem. Zeitschr., 1926, CLXVIII, S. 340.

[6]) J. Bodnár, L. Szepessy u. J. Ferenczy, Die Anwendung der Neubergschen Azetaldehyd-Abfangmethode bei der alkoholischen Gärung höherer Pflanzen, ebenda, 1925, CLXV, S. 16.

[7]) C. Neuberg u. Mitarbeiter z. B., ebenda, 1920, CXII, S. 144. — C. Neu-

Ameisensäure

Ameisensäure, zuerst von Aschoff in Pinus abies (Holz und Nadeln) aufgefunden, wurde in geringer Menge (frei oder gebunden) aus sehrvielen Pflanzen, besonders in Früchten (Ceratonia siliqua, Juniperus communis, Tamarindus indica, Sapindus saponaria), ferner aus Sempervivum tectorum isoliert; nachgewiesen in den Brennnesselhaaren neben anderen flüchtigen Säuren (wahrscheinlich Essigsäure, sicher Buttersäure, Flury), auch in Kryptogamen (Plasmodien, Secale cornutum, Vaucheria) und ganz allgemein in Wurzelspitzen (Goebel, Czapek, Kunze). Nach den makrochemischen Befunden von Stocklasa und Ernest[1]) fehlt aber Ameisensäure im Wurzelsekret. Bergmann[2]) destillierte getrocknete feinzerriebene Pflanzenteile mit etwas Weinsäure im strömenden Wasserdampf und wies Ameisensäure im Destillat makrochemisch nach.

Innerhalb der Zellen wurde Ameisensäure in Wurzeln nachgewiesen, indem Wurzelstücke in eine konzentrierte wässerige Sublimatlösung gebracht wurden, die mit Wasser auf das fünf- oder zehnfache verdünnt war. Dann wird im Wasserbade 1—2 Stunden erhitzt, sowie in Wasser und nachher in salzsäurehaltigem Wasser abgespült und nun das Material auf einige Minuten in eine schwach erwärmte 1proz. Kalilauge getaucht. Ameisensäurehaltige Teile zeigen sich durch Schwärzung an. In den Präparaten findet man die Schwärzung im Protoplasma (nicht im Zellsaft und Zellkern). Metallinstrumente dürfen bei der Reaktion nicht benutzt werden. Calomelbildung wurde zum Nachweis der Ameisensäure im Wurzelsekret herangezogen. Die Objekte gelangen in Sublimatlösung und werden bis auf 80° erhitzt. Die Ameisensäure reduziert Quecksilberchlorid zu Quecksilberchlorür, welches sich in sehr kleinen, in Salzsäure unlöslichen Würfeln abscheidet (Czapek[3]), Goebel[4])). Die Reaktion kann allerdings auch bei Gegenwart anderer reduzierender Stoffe eintreten. Deshalb brachte Kunze[5]) die Säure als Bleisalz nach Behrens (Mikrochem. Reaktionen, IV) zur Abscheidung. Die Kristalle des Bleiformiats sollen gut kristallographisch bestimmbar sein. Die angeführten Reaktionen müßten jedenfalls noch eingehender studiert werden, da die Gegenwart von Ameisensäure im Wurzelsekret bestritten worden ist (s. oben).

berg u. A. Gottschalk, Über den Nachweis von Azetaldehyd als Zwischenstufe bei der anaeroben Atmung höherer Pflanzen, Biochem. Zeitschr., 1925, CLX, S. 256.

[1]) J. Stocklasa u. A. Ernest, Beiträge zur Lösung der Frage der chemischen Natur des Wurzelsekretes, Jahrb. f. wiss. Bot., 1909, XLVI, S. 55.

[2]) E. Bergmann, Nachweis der Ameisensäure, Bot. Ztg., 1882, XL, S. 731.

[3]) F. Czapek, Zur Lehre von den Wurzelausscheidungen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1896, XXIX, S. 321.

[4]) K. v. Goebel, Pflanzenbiologische Schilderungen II, Marburg, 1891, S. 211.

[5]) G. Kunze, Über Säureausscheidung bei Wurzeln und Pilzhyphen und ihre Bedeutung, Jahrb. f. wiss. Bot., 1906, XLI, S. 360.

Zu versuchen wäre bei pflanzlichen Objekten noch folgende Reaktion: Eine Lösung von Ceronitrat, die bei Gegenwart von freier Ameisensäure einen Zusatz von Magnesiumazetat erhält, gibt mit Ameisensäure beim Eindunsten große, meist nicht gut ausgebildete, aber recht charakteristische Pentagondodekaëder von Ceriumformiat.

Isovaleriansäure

Veresterter Bestandteil ätherischer Öle, so als Ester des Borneols im ätherischen Öl des Baldrians.

Flüssigkeit, die nach Baldrian und faulem Käse riecht, Kp. 176,7°. Zum mikrochemischen Nachweis ist besonders das Kupfersalz geeignet, das man aus der Säure durch Zusatz von Kupferazetat erhält: dunkelgrüne rechteckige Täfelchen und Prismen, auch in schiefgekreuzten Zwillingen, Drillingen und kugligen Aggregaten.

Sven Svensson[1]) unterwarf das Pulver von Baldrianwurzel unter Zusatz von verdünnter Phosphorsäure der Mikrosublimation und erhielt so Tropfen, die mit 2proz. Kupferazetatlösung die Kristalle des Kupfervalerianats ergaben.

Dasselbe Ergebnis wurde mit Radix levistici, Radix angelicae, und einer unbekannten chinesischen Wurzel erhalten.

Pflanzensäuren

Um Oxalsäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure, Zitronen- und Weinsäure in Geweben nachzuweisen, gehen Klein und Werner[2]) in folgender Weise vor: 0,5—5 mg Gewebe werden in einem Kupferschälchen mit 0,2—2 mg konzentrierter Phosphorsäure versetzt, mit Nadeln fein zerzupft, bei 60—70° 15 Minuten getrocknet und dann der fraktionierten Sublimation im Klein-Wernerschen Vakuumapparat (s. S. 40) unterworfen.

1. Fraktion bei 110°: Oxalsäure. Die Sublimate bestehen in der Regel zuerst aus längeren Prismen, die bald in kleinere Kriställchen zerfallen, der Nachweis erfolgt als Strontiumsalz oder bei geringen Mengen als Kalziumsalz.

2. Fraktion bei 130°: Bernsteinsäure[3]). Die kleinen Kriställchen des Sublimats führt man am besten in das Bleisalz über.

[1]) Sven Svensson, Mikrosublimationsförsök med rhizoma valerianae, Farmacevtisk Revy, 1928, No. 50.

[2]) G. Klein u. O. Werner, Der mikro- und histochemische Nachweis von freier und gebundener Oxalsäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure, Weinsäure und Zitronensäure, Zeitschr. physiol. Chem., 1922, CXXXXIII, S. 141.

[3]) Klein u. Werner fanden Bernsteinsäure in Rheum undulatum (Blattstiel), Vitis vinifera (Frucht).

3. Fraktion bei 145°: Anhydride der Apfelsäure. Das zunächst entstehende amorphe Sublimat bildet beim Liegen an der Luft nach einiger Zeit zerfließliche Nädelchen von Apfelsäure. Zu ihrem Nachweis versetzt man das Sublimat mit einem Tropfen 1—5proz. Silbernitratlösung und bringt das Präparat in einen auf 40° erhitzten Wärmeschrank, in dem sich eine flache Schale mit 5proz. Ammoniaklösung befindet. Nach 10—20 Minuten entstehen Kügelchen, Scheibchen, eventuell Rosetten von vier- und achteckigem Umriß, seltener auch Nädelchen. Auskristallisiertes Silbernitrat wird durch Anhauchen in Lösung gebracht.

4. Fraktion bei 170°. Anhydride der Zitronensäure. Amorpher Beschlag, den man nach dem soeben beschriebenen Verfahren in das Silbersalz überführt: Sphärite aus feinen Nadeln.

5. Fraktion bei 195°. Anhydride der Weinsäure. Amorphes Sublimat, aus dem an der Luft allmählich Wetzsteinformen oder Zerrformen der Weinsäure auskristallisieren. Man stellt aus ihnen durch eine Ammoniakatmosphäre bei 40° (siehe unter 3.) Ammoniumtartrat (Wetzsteinformen) her und aus diesen mit Silbernitrat und Essigsäure das Silberbitartrat, das meist in knieförmigen Zwillingen auskristallisiert.

Schalen nicht mehr keimfähiger Bohnen geben im Gegensatz zu Schalen frischer Bohnen kein Sublimat von Bernstein- und Zitronensäure, A. Niethammer, Biochem. Zeitschr., 1930, CCXX, S. 356.

Oxalsäure

Oxalsäure (Scheele 1776) kann jedenfalls auf mehr als einem Wege in der Pflanze entstehen. In Betracht kommen: Entstehung im aufbauenden oder assimilatorischen Stoffwechsel (Bauer, Steinmann, Bassalik), durch unvollständige Verbrennung von Kohlenhydraten (Kraus, Mayer, Pfeffer, Warburg, Wehmer, Czapek), Bildung als Nebenprodukt der Eiweißsynthese (Palladin, Schimper, Meyer).

Da ein zuerst von Zalesky u. Reinhard beobachtetes[1]), von Bassalik[2]) nachgewiesenes Enzym, welches Oxalat oxydiert, in den Pflanzen allgemein verbreitet ist, so ist anzunehmen, daß Oxalate auch in den säurefreien Pflanzen in reichlicher Menge gebildet, jedoch durch das Enzym alsbald wieder abgebaut werden (Staehelin)[3]).

[1]) Zaleski u. Reinhard, Über die fermentative Oxydation der Oxalsäure, Biochem. Zeitschr. 1911, XXXIII, S. 449.

[2]) K. Bassalik, Über die Verarbeitung der Oxalsäure des Bacillus extorquens Jahrb. f. wiss. Botan., 1913, LIII, S. 235. Derselbe, Über die Rolle der Oxalsäure bei den grünen Pflanzen. Die Zersetzung der Oxalsäure bei Rumex acetosa, Bull. acad. sciences Cracovie, 1917, S. 203.

[3]) M. Staehelin, Die Rolle der Oxalsäure in der Pflanze. Enzymatischer Abbau des Oxalations, Biochem. Zeitschr., 1919, XCVI, S. 1.

Zu versuchen wäre bei pflanzlichen Objekten noch folgende Reaktion: Eine Lösung von Ceronitrat, die bei Gegenwart von freier Ameisensäure einen Zusatz von Magnesiumazetat erhält, gibt mit Ameisensäure beim Eindunsten große, meist nicht gut ausgebildete, aber recht charakteristische Pentagondodekaëder von Ceriumformiat.

Isovaleriansäure

Veresterter Bestandteil ätherischer Öle, so als Ester des Borneols im ätherischen Öl des Baldrians.

Flüssigkeit, die nach Baldrian und faulem Käse riecht, Kp. 176,7°. Zum mikrochemischen Nachweis ist besonders das Kupfersalz geeignet, das man aus der Säure durch Zusatz von Kupferazetat erhält: dunkelgrüne rechteckige Täfelchen und Prismen, auch in schiefgekreuzten Zwillingen, Drillingen und kugligen Aggregaten.

Sven Svensson[1]) unterwarf das Pulver von Baldrianwurzel unter Zusatz von verdünnter Phosphorsäure der Mikrosublimation und erhielt so Tropfen, die mit 2proz. Kupferazetatlösung die Kristalle des Kupfervalerianats ergaben.

Dasselbe Ergebnis wurde mit Radix levistici, Radix angelicae, und einer unbekannten chinesischen Wurzel erhalten.

Pflanzensäuren

Um Oxalsäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure, Zitronen- und Weinsäure in Geweben nachzuweisen, gehen Klein und Werner[2]) in folgender Weise vor: 0,5—5 mg Gewebe werden in einem Kupferschälchen mit 0,2—2 mg konzentrierter Phosphorsäure versetzt, mit Nadeln fein zerzupft, bei 60—70° 15 Minuten getrocknet und dann der fraktionierten Sublimation im Klein-Wernerschen Vakuumapparat (s. S. 40) unterworfen.

1. Fraktion bei 110°: Oxalsäure. Die Sublimate bestehen in der Regel zuerst aus längeren Prismen, die bald in kleinere Kriställchen zerfallen, der Nachweis erfolgt als Strontiumsalz oder bei geringen Mengen als Kalziumsalz.

2. Fraktion bei 130°: Bernsteinsäure[3]). Die kleinen Kriställchen des Sublimats führt man am besten in das Bleisalz über.

[1]) Sven Svensson, Mikrosublimationsförsök med rhizoma valerianae, Farmacevtisk Revy, 1928, No. 50.

[2]) G. Klein u. O. Werner, Der mikro- und histochemische Nachweis von freier und gebundener Oxalsäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure, Weinsäure und Zitronensäure, Zeitschr. physiol. Chem., 1922, CXXXXIII, S. 141.

[3]) Klein u. Werner fanden Bernsteinsäure in Rheum undulatum (Blattstiel), Vitis vinifera (Frucht).

3. Fraktion bei 145°: Anhydride der Apfelsäure. Das zunächst entstehende amorphe Sublimat bildet beim Liegen an der Luft nach einiger Zeit zerfließliche Nädelchen von Apfelsäure. Zu ihrem Nachweis versetzt man das Sublimat mit einem Tropfen 1—5proz. Silbernitratlösung und bringt das Präparat in einen auf 40° erhitzten Wärmeschrank, in dem sich eine flache Schale mit 5proz. Ammoniaklösung befindet. Nach 10—20 Minuten entstehen Kügelchen, Scheibchen, eventuell Rosetten von vier- und achteckigem Umriß, seltener auch Nädelchen. Auskristallisiertes Silbernitrat wird durch Anhauchen in Lösung gebracht.

4. Fraktion bei 170°. Anhydride der Zitronensäure. Amorpher Beschlag, den man nach dem soeben beschriebenen Verfahren in das Silbersalz überführt: Sphärite aus feinen Nadeln.

5. Fraktion bei 195°. Anhydride der Weinsäure. Amorphes Sublimat, aus dem an der Luft allmählich Wetzsteinformen oder Zerrformen der Weinsäure auskristallisieren. Man stellt aus ihnen durch eine Ammoniakatmosphäre bei 40° (siehe unter 3.) Ammoniumtartrat (Wetzsteinformen) her und aus diesen mit Silbernitrat und Essigsäure das Silberbitartrat, das meist in knieförmigen Zwillingen auskristallisiert.

Schalen nicht mehr keimfähiger Bohnen geben im Gegensatz zu Schalen frischer Bohnen kein Sublimat von Bernstein- und Zitronensäure, A. Niethammer, Biochem. Zeitschr., 1930, CCXX, S. 356.

Oxalsäure

Oxalsäure (Scheele 1776) kann jedenfalls auf mehr als einem Wege in der Pflanze entstehen. In Betracht kommen: Entstehung im aufbauenden oder assimilatorischen Stoffwechsel (Bauer, Steinmann, Bassalik), durch unvollständige Verbrennung von Kohlenhydraten (Kraus, Mayer, Pfeffer, Warburg, Wehmer, Czapek), Bildung als Nebenprodukt der Eiweißsynthese (Palladin, Schimper, Meyer).

Da ein zuerst von Zalesky u. Reinhard beobachtetes[1]), von Bassalik[2]) nachgewiesenes Enzym, welches Oxalat oxydiert, in den Pflanzen allgemein verbreitet ist, so ist anzunehmen, daß Oxalate auch in den säurefreien Pflanzen in reichlicher Menge gebildet, jedoch durch das Enzym alsbald wieder abgebaut werden (Staehelin)[3]).

[1]) Zaleski u. Reinhard, Über die fermentative Oxydation der Oxalsäure, Biochem. Zeitschr. 1911, XXXIII, S. 449.

[2]) K. Bassalik, Über die Verarbeitung der Oxalsäure des Bacillus extorquens Jahrb. f. wiss. Botan., 1913, LIII, S. 235. Derselbe, Über die Rolle der Oxalsäure bei den grünen Pflanzen. Die Zersetzung der Oxalsäure bei Rumex acetosa, Bull. acad. sciences Cracovie, 1917, S. 203.

[3]) M. Staehelin, Die Rolle der Oxalsäure in der Pflanze. Enzymatischer Abbau des Oxalations, Biochem. Zeitschr., 1919, XCVI, S. 1.

„Das Oxalation wird überall dort gebildet, wo energische Oxydationen stattfinden. In Übereinstimmung damit steht die Tatsache, daß Kalziumoxalat namentlich in Geweben mit großer Lebenstätigkeit, insbesondere zur Zeit ihrer maximalen Aktivität entsteht" (Frey)[1]. Die Bildung der Oxalsäure erfolgt im Dunkeln (Visser)[2].

In freiem Zustande tritt sie sehr selten auf und wurde nur in Boletus sulfureus, B. ignarius (Tripier), Cicer arietinum (Trichome der Kichererbse, Dulong) und Juglans regia (männliche Kätzchen, Rochleder) angegeben. In größerer Menge wirkt sie auf die Pflanzen giftig (Gramineen können größere Quantitäten ohne Schaden vertragen, Bruch, Hartleb).

Der Nachweis freier Oxalsäure kann ohne Sublimation auf mikrochemischem Wege allein kaum mit Sicherheit geführt werden, zumal es sich in allen Fällen nur um Spuren handeln wird. Reine Oxalsäure ist leicht löslich in Wasser, verdünnten Säuren und Glyzerin, löst sich aber nur schwer in Äther. Sie bildet langgestreckte monokline Prismen und Kombinationen (Haushofer, Mikr. Reakt., S. 82, Fig. 62) und sublimiert bei sehr vorsichtigem Erhitzen leicht (Behrens) in weißen Nadeln.

Fast stets tritt die Oxalsäure in Form von Salzen auf, und zwar in kristallinischer Form (Kalziumsalz, Magnesiumsalz) oder in Form von im Zellsaft gelösten Salzen (Kaliumsalz).

Die Oxalatkristalle kommen in den meisten Familien vor (Ausnahmen nach Kohl: Moose, Cyperaceen, Najadaceen, Lemnaceen, Orobanchaceen, Rhinanthaceen, Lentibulariaceen), sowie in allen Teilen der Pflanzen. Sie werden als Exkrete betrachtet. Die Oxalate werden als Schutzwaffen gegen Tiere betrachtet (infolge ihrer peripheren Lagerung und ihrer giftigen Wirkung, der Käfer Gastroidea viridula frißt aber mit Vorliebe oxalsäurehaltige Blätter, Verschaffelt, s. Senfölglykoside) und Netolitzky hat beobachtet, daß bestimmte Schmetterlingsraupen gerade auf Raphidenpflanzen spezialisiert sind. Bei Raphiden ist die Schutzwirkung (Stahl), die allerdings von Lewin bezweifelt wird, eine mechanische. Dafür spricht auch der anatomische Befund (Haberlandt). In einzelnen Fällen (Rinden der Cupressineen) soll das Kalziumoxalat eine mechanische Bedeutung besitzen (Sinz). Reichliches Vorkommen von Oxalaten ist auf das Aussehen von Pflanzen und Drogen zuweilen von Einfluß. Die Graufärbung von Cort. Cascarillae rührt von Oxalaten her, ebenso die graue Zeichnung der Querschnitte mancher Drogen (Cort. Frangulae, Rhiz. Gelsemii) und das Glitzern im Lichte (Iris, Guajacum, China, Quillaja). Der Gesamtgehalt an Oxalsäure schwankt in weiten Grenzen; meist beträgt er nur wenige Prozente (Oxalis acetosella 1,1 %), doch auch 7,3 % (Rheum), 20,7 % (Guajacum) und steigt bis zu 80 % (Cacteen). In mehrjährigen Koniferennadeln ist der Gehalt höher als in einjährigen.

---

[1]) A. Frey, Kalziumoxalat-Monohydrat und -Trihydrat in der Pflanze. Viertelsjahrschr. naturforsch. Ges., Zürich, 1925, LXX, S. 1.

[2]) A. W. Visser, Die Bildung von Oxalsäure im tierischen und pflanzlichen Organismus, Apoth.-Ztg., 1913, XXVIII, S. 944.

Aus Untersuchungen von Molisch[1]) und Patschovsky[2]) geht hervor, daß lösliche Oxalate im Pflanzenreich weit verbreitet sind.

Pflanzen ohne normale Ablagerung von Kalziumoxalat enthalten auch keine gelösten Oxalate. Sie sind bei den Thallophyten seltener als bei den Kormophyten und treten regelmäßig bei den Polygonales und Centrospermae auf. Die Lokalisation ist vorzugsweise peripher (Patschovsky).

Über Oxalsäure in Schimmelpilzkulturen s. T. Chrzaszcz und D. Tinkow, Biochem. Zeitschr., 1930, CCXVIII, S. 73.

Das verbreiteste unlösliche Oxalat ist das **Kalziumoxalat.** Nach Arthur Meyer[3]) bildet es sich aus dem bei der Eiweißbildung in den Autoplasten frei werdenden Kalzium und aus Oxalsäure, welche auf einen Reiz des frei werdenden Kalziums hin von den Protoplasten gebildet wird. Es entsteht ganz allgemein immer, wenn Kalzium — und Oxalationen sich im Lauf des Stoffwechsels begegnen.

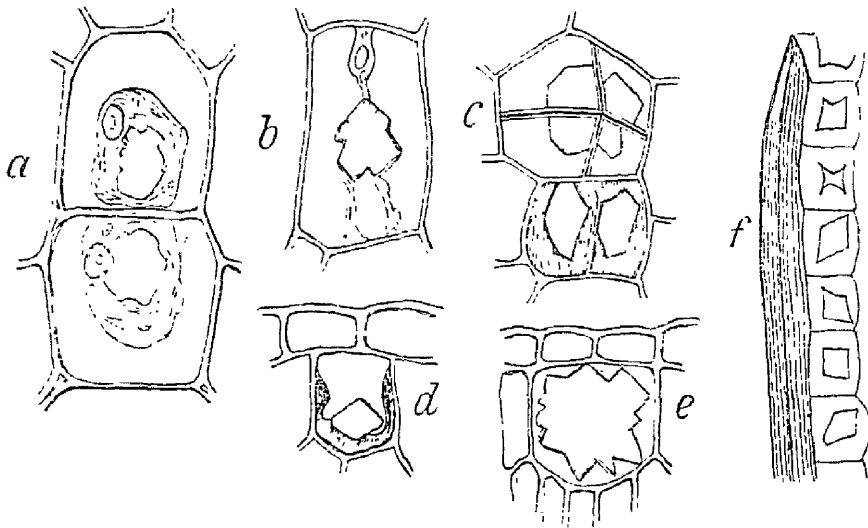



Fig. 47. Hüllen der Oxalatkristalle nach dem Lösen der Kristallsubstanz. Ricinus communis, *a*) jugendliche, *b*) ältere Markzelle, *c*) Ononis spinosa (Wurzel), *d*) Citrus (Blatt, Kristalltasche), *e*) Juglans regia (Blatt), *f*) Rhamnus frangula (Rinde) (Tunmann)

„Das Kalziumoxalat dient in seiner Gesamtheit sowohl der Entfernung von Kalziumionen, als auch der Bindung der Oxalationen. Im ersten Falle wird in gewissem Sinne das Trihydrat, im zweiten das Monohydrat bevorzugt. Exkretbehälter, die gewöhnlich Monohydrat führen, vereinigen die beiden Aufgaben in sich. Drittens mag das schwerlösliche Salz in vielen Fällen bei der Regulierung der osmotischen Verhältnisse eine Rolle spielen" (A. Frey).

---

[1]) H. Molisch, Über den mikrochemischen Nachweis und die Verbreitung gelöster Oxalate im Pflanzenreiche, Flora 1918, N. F., XI u. XII, S. 60; dort auch eine Liste von Pflanzen, die gelöste Oxalate enthalten.

[2]) N. Patschovsky, Ber. deutsch. bot. Ges., 1918, XXXVI, S. 542.

[3]) A. Meyer, Die Beziehung zwischen Eiweiß und Samenbildung in Laubblättern, Ber. deutsch. bot. Ges., 1918, XXXVI, S. 508.

Kalziumoxalat ist in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle ein Exkret, das nicht wieder in den Stoffwechsel einbezogen wird.

Eine Auflösung der Oxalate wurde beobachtet von G. Kraus und seinen Schülern (Rosaceen), Frank (Orchis), Tschirch (Begonia), Tunmann (Grindelia), Alexandrow u. Timofeev (Sterculia); bei der Gummibildung (Amygdalaceen, Mikosch, Bromeliaceen, Boresch) u. a.; eine Zusammenstellung derartiger Fälle bei: Br. Massopust, Lotos, 1906, Nr. 7 u. 8.

Auflösen von Kalkoxalat während der Reife und Überreife von Orangen, Mandarinen und Zitronen, A. Niethammer, Biochem. Zeitschr., 1930, CCXX, S. 354.

Kalziumoxalat ist dimorph. Die in der Pflanze vorkommenden Kristalle gehören teils dem tetragonalen (quadratischen) System (mit 3 Mol. Kristallwasser), teils dem monosymmetrischen (monoklinen) System an (mit 1 Mol. Kristallwasser)[1]. Im polarisierten Lichte leuchten tetragonale Kristalle schwach, monokline stark in bunten Farben.

Das Kalziumoxalat-Trihydrat ist in der Pflanze metastabil; es bildet sich in an Kalziumoxalat übersättigten, osmotisch aber verdünnten Lösungen[2] und hat die Tendenz, in Monohydrat überzugehen.

Eigenschaften von Monohydrat und Trihydrat nach Frey.

	Monohydrat	Trihydrat
Kristallographie	monoklin	tetragonal
Achsenverhältnis	0,8696 : 1 : 1,3695 Winkel $\beta = 107^0 18'$	1 : 0,4118
Formen	$c\{\bar{1}01\}$ $x\{011\}$ $b\{010\}$ $m\{110\}$	$p\{111\}$ $\delta\{301\}$ $m\{110\}$
Zwillingsgesetze	$n \cdot e\ (\bar{1}01)$	$n\ (201)$
Optik	positiv	positiv
Brechungsindices n_α, n_β, n_γ	$n_\alpha = 1{,}545$ $n_\beta = 1{,}555$ $n_\gamma = 1{,}650$	$n_\alpha = 1{,}552$ $n_\gamma = 1{,}583$
Doppelbrechung	$n_\gamma - n_\alpha = 0{,}160$	$n_\gamma - n_\alpha = 0{,}031$
opt. Orientierung	$n_\alpha = b$ n_γ bildet mit c $29\frac{1}{2}^0$ i. st. $\sphericalangle \beta$	$n_\alpha = n_w = a$ $n_\gamma = n_\varepsilon = c$
Achsenwinkel 2 E	84^0	—
Auslöschung	7^0 gegen $e\ (\bar{1}01)$	gerade

[1]) Smith, On the occurrence of Calcium oxalate in the barks of the Eucalyptus, Proceed. Roy. Soc. New South Wales, 1905, nach Bot. Centralbl., 1907, CIV, S. 144. F. Netolitzky, Die Oxalatkristalle von Quillaja saponaria L., Pharmazeut. Post, 1919, LII, S. 349.

[2]) Nach einer anderen Angabe von Frey bildet sich das Trihydrat bei Überschuß von Kalzium, das Monohydrat bei Überschuß von Oxalat (A. Frey, Les

Seine Haltbarkeit wird durch Ca-Ionen erhöht, durch H- und C_2O_4-Ionen vermindert. Es tritt in Geweben mit geringerer Lebenstätigkeit und passiven Funktionen auf (Wassergewebe, einschl. Hautgewebe) und wird nicht lokalisiert.

Das Monohydrat findet sich namentlich in Geweben mit intensiver aktiver Lebenstätigkeit (Bildungsgewebe, Assimilationsgewebe, Leitparenchym), stört hier und wird lokalisiert.

Das Monohydrat neigt bei rascher Kristallisation dazu, Drusen zu bilden, während bei langsamer, ruhiger Kristallisation Einzelkristalle entstehen; es entsteht in Lösungen mit hohen osmotischen Werten.

Die Idioblasten führen fast ausschließlich, die Kristallfasern immer Monohydrat, während das Trihydrat mit Vorliebe über die Gewebe zerstreut auftritt.

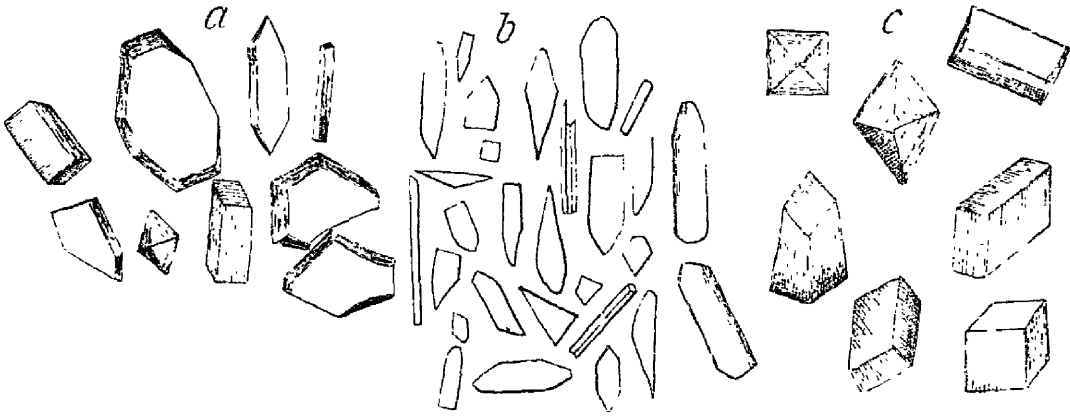



Fig. 48. Einzelkristalle von Kalziumoxalat. *a*) Arctostaphylos uva ursi (Blatt), *b*) Krameria triandra (Wurzel, stark vergrößert), *c*) Jatrorrhiza palmata (Wurzel) (Tunmann)

Das Monohydrat tritt in Einzelkristallen, Raphiden, Kristallsand, Drusen und Sphärokristallen auf, das Trihydrat in Einzelkristallen und Drusen.

Einzelkristalle (Fig. 48) treten häufig in Zwillingsformen auf. Für die großen Einzelkristalle im Mesophyll von Agave mexicana ist ein Gewicht von 0,00055 mg berechnet (Andrews). Sehr große Einzelkristalle findet man in Irisarten (Rhizom), sehr kleine, nur im polarisierten Lichte sicher zu erkennende, in vielen Drüsenzellen.

Drusen sind rundliche Kristallgruppen mit zentralem Stützpunkt, meist von morgensternförmiger Gestalt. Sehr große Drusen sind im Rhizom der Rheumarten und in den Blättern von Juglans regia, sehr kleine oft in den sezernierenden Zellen der Drüsen (Grindelia). „Drusenartige Gebilde" fand F. Mayer[1]) im Meso-

formes cristallines de l'oxalate de calcium dans la plante et les causes, qui déterminent ces formes, Compt. rend. séances soc. phys. et d'hist. nat. Genève, 1923, XL, S. 8.

[1]) F. Mayer, System.-anatom. Unters. der Pogostemoneae Reichenb., Erlangen, Dissertation, 1909, S. 39.

phyll der Pogostemoneen; diese kommen dadurch zustande, daß zahlreiche Kristallnädelchen durch Fettmassen zusammengehalten werden und derart Drusen vortäuschen.

In den Drusen ist mehr oder weniger ein kleiner Einschluß im Zentrum sichtbar, den Sanio als proteinhaltig ansprach. Dieser Zentralkörper, der nach Buscalioni ein Schleimkörper, corpo mucilaginoso, sein soll, tritt bei Betrachtung der Objekte in Kanadabalsam deutlich hervor, wobei die Kristallmasse unsichtbar wird. Der Körper löst sich nicht in Äther, Weingeist, Chloroform, Schwefelsäure; er ist langsam in Chromsäure löslich, wird von Jodalkohol schwach gelb und auch von Osmiumsäure und Ferrichlorid gelblich gefärbt. Die Substanz ist färbbar mit Anilinblau, Alkannatinktur, Methylenblau, Säurefuchsin und bildet grüne Kupferverbindungen. Buscalioni[1]) bringt 1 cm lange Stücke kalziumoxalatreicher Pflanzen auf einen Monat in eine konzentrierte wässerige Lösung von Kupfersulfat oder Kupferazetat, stellt Mikrotomschnitte her, behandelt diese 1—2 Tage im Thermostaten bei 38° mit 1—30proz. Essigsäure zur Lösung des Kupferniederschlags und färbt schließlich. Man wird den Schlußfolgerungen, daß es sich hierbei um einen schleimartigen Stoff (Pektin) handelt, nicht völlig beistimmen können. Es scheinen vielmehr verschiedene Stoffe am Aufbau des Zentralkörpers beteiligt zu sein und darunter vornehmlich Fette. Es gelang wiederholt den Kern in weingeistigem Chloralhydrat zu lösen und die Reaktionen von Buscalioni scheinen ebenfalls für die Gegenwart fettartiger Substanzen zu sprechen.

Raphiden sind nadelförmige Kristalle des monoklinen Systems. Sie sind meist gleichsinnig zu Bündeln vereint, die stets von einer manchmal verkorkten Hülle von Kohlehydratlamellen eingeschlossen sind; oft sind sie in Schleim eingebettet. In der Epidermis sind Raphiden selten. Die Randzellen der kreiselförmigen Schuppenhaare am Pistill von Cocos nucifera sind mit je einem Raphidenbündel erfüllt[2]). Das Gewicht einer einzelnen Raphide von Agave mexicana berechnet Andrews zu 0,0000038 mg (Lit. 25,1).

Die Raphiden verhalten sich in mancher Beziehung anders als die übrigen Formen des Kalziumoxalats. Der Gehalt an Raphiden variiert nicht bei verschiedenen Stickstoffquellen und bleibt auch bei vollkommenen Stickstoffentzug unverändert. Sie sollen zu ihrer Bildung bedeutend weniger Kalzium brauchen, als die übrigen Oxalatkristalle, treten in den Sproßspitzen früher auf als die anderen Kristalle und scheinen als ein gewissermaßen notwendiger Bestandteil der Pflanzen

---

[1]) L. Buscalioni, Studii sui cristalli di ossalato di calcio, Malpighia 1895, IX, S. 469, 1896, X, S. 3.

[2]) M. Moebius, Über Raphiden in den Epidermiszellen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 485.

zuerst angelegt zu werden. Licht beeinflußt die Bildung der Raphiden nicht (W. Müller)[1].

Sphärite sind selten. Zuerst machte v. Höhnel[2]) auf sie aufmerksam bei Terminalia, dann Hegelmaier[3]) bei den Samenschalen der Caryophyllaceen und Moebius[4]) bei Mamillaria, Cereus und Phyllocactus, sowie bei Broussonetia, bei der sie im Endokarp auftreten, 18—25 μ lang werden und von der Wand einseitig umwachsen werden. Die Sphärite leuchten bei gekreuzten Nicols farbig auf, die der Kakteen zeigen ein orthogonales schwarzes Kreuz, nicht aber die von Broussonetia. Die Sphärite in Phallus caninus hält de Bary[5]) für oxalsauren Kalk.

Von Wehmer[6]) wurde wiederholt die Vermutung ausgesprochen, daß Raphiden und Sphärokristalle bei Phanerogamen aus Zitraten bestehen und nicht aus Kalkoxalat.

Ziegenspeck[7]) hat aber auf makrochemischem Wege einwandfrei bewiesen, daß die Raphiden von Scilla maritima aus oxalsaurem Kalk bestehen.

Der Kristallsand besteht aus sehr kleinen Einzelkristallen, die in großer Zahl in den Zellen auftreten. Die Doppelbrechung des Kristallsands der Solaneen scheint die des Monohydrats zu sein. Gute Beispiele für das Vorkommen von Kristallsand sind Rinde und Gefäßbündelscheide der Amarantus- und Euxolus-Arten, auch Chenopodium foetidum und Ch. ambrosioides L.

Ist der Kristallsand sehr dicht, so erscheinen die Kristallsandzellen oft schwarz, vgl. dazu auch:

G. Beck von Mannagetta, Über die Ausbildung und das Aussehen von oxalsaurem Kalk bei Araceen, Sitzgsber. „Lotos", 1912, LX, S. 192.

Jaccard u. Frey[8]) unterscheiden bei Allium-Arten 10 Ausbildungstypen von Kalziumoxalat. Der erste Typus cepa zeichnet sich durch lange, schlanke Trihydrat-Prismen aus. Im zweiten Typus (sativum) ist das Prisma so lang als breit. Beim dritten Typus (ursinum) ist das Prisma verschwunden. Im Typus sphaerocephalum sind weitere Prismen mit dem cepa-Prisma verwachsen, beim

[1]) W. Müller, Über die Abhängigkeit der Kalkoxalatbildung in der Pflanze von den Ernährungsbedingungen, Beihefte z. bot. Centralbl., 1922, XXXIX, S. 321.

[2]) Fr. v. Höhnel, Beitr. z. Anat. u. Phys., Bot. Ztg., 1882, XL, S. 177.

[3]) F. Hegelmaier, Jahrb. f. wiss. Bot., 1874, IX, S. 286.

[4]) M. Moebius, Sphärokrist. v. Kalkoxalat b. Kakteen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1885, III, S. 178 u. Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, XXXIV, S. 425.

[5]) A. de Bary, Morph. u. Biol. d. Pilze, 2. Aufl., S. 12.

[6]) C. Wehmer, Zur Charakteristik des zitronensauren Kalkes und einige Bemerkungen über die Stellung der Zitronensäure im Stoffwechsel, Ber. deutsch. bot. Ges., 1892, XI, S. 333.

[7]) H. Ziegenspeck, Die chemische Zusammensetzung der Raphiden von Scilla maritima, Ber. deutsch. bot. Ges., 1914, XXXII, S. 630.

[8]) P. Jaccard u. A. Frey, Kristallhabitus und Ausbildungsformen des Kalziumoxalat als Artmerkmal. Vierteljahrsschrift Züricher Naturforsch. Ges., 1928, LXXIII, S. 127.

Typus schoenoprasum unterbleibt die Ausbildung der Endpyramiden. Typus oleraceum entsteht, wenn die Pyramidenflächen (111) und 11$\bar{1}$ einseitig auswachsen und im extremen Fall die Prismenfläche (110) zum Verschwinden bringen. Im 7. Typus (ampeloprasum) besitzen die Kristalle auffallende schwarze Kerne, einzelne Artindividuen besitzen Trihydrat, andere Monohydrat. Beim 8. Typus (montanum) treten beide Hydratstufen in derselben Zelle auf. Im 9. Typus (globosum) tritt nur Monohydrat in Form von Kristallsand auf. Im 10. Typus (victorialis) tritt hin und wieder etwas Sand oder eine kleine Trihydrat-Bipyramide auf.

Die Bildung von Monohydrat scheint bei den meso- und hygrophilen Arten begünstigt.

Nach Greta Hammarsten (Compt. rend. Lab. Carlsberg, XVII, Nr 11, S. 1) bildet Kalziumoxalat drei verschiedene Hydrate, das monokline Monohydrat, das tetragonale Dihydrat und das in cholesterinähnlichen, parallelogrammartig begrenzten Platten kristallisierende Trihydrat.

Ganz überwiegend erscheint die Oxalsäure im Gewebe als **Kalziumoxalat.** Die Kalziumoxalatkristalle (Kalkoxalate) sind entweder der Membran eingelagert (Solms-Laubach, Pfitzer), oder sie befinden sich, wie in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle, im Zellinhalte. Letztere entstehen im Plasma, nach Wakker in den Vakuolen des Plasma, jedenfalls innerhalb des Plasmaschlauches. Sie umgeben sich später oft mit einer Hüllhaut, wie die Drusen Rosanoffs. Die Hülle kann durch Balken mit der Zellwand in Verbindung treten (Kerria, Tilia, Ricinus). Bei Studien über die Bildung der Haut (lebendes Material) muß die Lösung der Kristallsubstanz durch stark verdünnte Salzsäure sehr vorsichtig bewirkt werden, da sonst die noch jugendlichen Gebilde leicht fortgerissen werden. Bei den Aurantiaceen werden die monoklinen Kristalle von der Zellwand gewissermaßen eingefangen, und einseitig umwachsen (Oxalattaschen Pfitzers). In anderen Fällen, vorzüglich bei Kristallkammerfasern und bei analogen Bildungen wächst die Membran auf allen Seiten gleichmäßig bis an den im Zentrum der Zelle liegenden Kristall heran, so daß nach dem Lösen des oxalsauren Kalkes das Lumen den Umriß des Kristalles zeigt. Die umhüllende Substanz pflegt zuweilen in bestimmten Lamellen zu verholzen und zu verkorken (Fig. 47). Bei den Raphidenbündeln soll jede einzelne Raphide mit einer Hüllhaut umgeben sein (Wittlin).

Es ist bekannt, daß die Oxalatkristalle infolge ihrer Ausbildung und ihres Auftretens ein sehr wichtiges anatomisches Hilfsmittel bilden. Doch selbst zur makrochemischen Differentialdiagnose ist der oxalsaure Kalk herangezogen worden[1]).

[1]) J. Hendrick, Der Gehalt der Zimt- und Cassiarinde an Kalziumoxalat, Analyst, 1907, XXXII, S. 14. Cassiarinde hat nur bis 1,34 % Oxalat, Zimtrinde stets mehr und bis 6 %.

Kalziumoxalatkristalle finden sich als Einschlüsse der Aleuronkörner (s. d.) und der Ölplastiden (s. d.).

In der Zelle treten die Kristalle entweder hinter den übrigen Zellbestandteilen zurück oder sie bilden den hauptsächlichsten Zellbestandteil. In letzteren Fällen spricht man von Oxalatzellen oder Oxalatschläuchen[1]).

In der mikrochemischen Feststellung von Oxalatkristallen wurde früher oft leichtfertig vorgegangen. Häufig betrachtete man Kristalle, die sich in Chloralpräparaten vorfanden, als genügend identifiziert, wenn sie sich nicht in Essigsäure, wohl aber ohne Gasentwicklung in verdünnter Salzsäure lösten und mit Schwefelsäure Nadeln gaben. So sind vielfach Irrtümer in der Literatur entstanden. Daß die sichere Diagnose von Oxalatkristallen nicht immer leicht ist, erhellt am besten aus der Tatsache, daß wiederholt Zellkerne mit Oxalat verwechselt wurden (s. Zellkern) und daß andererseits andere Substanzen irrtümlich für Oxalate angesprochen wurden. Derartige Unstimmigkeiten finden sich sogar in wiederholt untersuchten Objekten. Um nur ein Beispiel anzuführen, kommen nach J. Moeller, A. Meyer und Tschirch in den Crocusnarben Oxalate vor, während diese nach Molisch und nach der eingehenden Studie von Müller[2]) bestimmt fehlen.

Zunächst ist zu beachten, daß in Chloralpräparaten, zumal in älteren, eine gänzliche oder teilweise Lösung der Oxalate erfolgen kann, falls das Chloralhydrat salzsäurehaltig ist (s. S. 44). Ebenso werden Oxalate in Chlorzinkjodlösung, die oft Salzsäure enthält, meist gelöst. Die Oxalate sind unlöslich in Wasser, auch beim Kochen, und in Essigsäure. Da der Essigsäure bei der Diagnose eine große Bedeutung zukommt, so ist daran zu erinnern, daß Oxalate nicht nur mit Zellulosehüllen, sondern zuweilen auch mit Schleimhüllen umgeben sind, die das Eindringen der Essigsäure hindern können. Man muß unter Umständen größere Quantitäten Essigsäure anwenden und längere Zeit einwirken lassen. Ferner ist Kalkzitrat ziemlich schwer in Essigsäure löslich und traubensaurer Kalk ist in Wasser und in Essigsäure unlöslich. Letzterer löst sich aber in Kalilauge und bleibt darin gelöst, während der oxalsaure Kalk in das Kalium-Kalk-Doppelsalz übergeht.

[1]) Über die Verbreitung der Oxalatkristalle in den Pflanzen vgl.: F. G. Kohl, Anatomisch-physiologische Untersuchungen der Kalksalze und Kieselsäure in der Pflanze, Marburg 1889, H. Solereder, Anatomie der Dikotyledonen, Egzbd., Stuttgart 1908, S. 347, und F. Netolitzky, Blattanatomie, 1905, 1908, 1911.

[2]) R. Müller, Über die vermeintlichen Oxalatkristalle im Safran, Zeitschr. d. allg. österr. Apoth.-Ver., 1903, XLVII, Nr. 29, Sep.

Weitere Identitätsreaktionen geben die Mineralsäuren. Oxalate lösen sich in verdünnter Salpeter-, Salz- und Schwefelsäure. Bei der Lösung in Salzsäure dürfen Gasblasen nicht auftreten (Unterscheidung von Karbonaten, s. S. 156). Mit Schwefelsäure müssen sich Gipskristalle bilden, die ebenfalls mikrochemisch zu identifizieren sind (s. S. 185) mit Jodsäure die Doppelpyramiden des Kalziumjodats[1]). Zur Unterscheidung von nativ vorkommenden Gipskristallen dient Chlorbaryumlösung. Gipskristalle überziehen sich in dieser mit einer Kruste von Baryumsulfat (Kohl), während Oxalate unverändert bleiben.

Um Kristalle sicher als Kalziumoxalat identifizieren zu können, muß außer dem Kalzium auch die Oxalsäure-Komponente nachgewiesen werden.

Zum Nachweis der Oxalsäure in Pflanzengeweben und ganz besonders zur Unterscheidung unlöslicher Oxalate von den entsprechenden Salzen der Weinsäure und Zitronensäure eignet sich das Plahlsche Reagens[2]), das 20 g Silbernitrat und 15 g Salpetersäure (spez. Gew. ungefähr 1,065 = etwa 12proz.) auf 100 ccm enthält. Unter diesen Umständen entsteht nur aus der Oxalsäure eine unlösliche Verbindung (Silberoxalat). Sie ist im durchfallenden Licht schwarz, im auffallenden weiß.

Wenn die Reaktion nicht sofort eintritt, muß man das Präparat in der feuchten Kammer aufbewahren oder mit Vaselin umschließen. In manchen Fällen ist zur Entfernung störender Bestandteile eine Vorbehandlung nötig. So muß man Schnitte durch das Rhabarberrhizom erst in Wasser, dann in Weingeist und dann wieder in Wasser legen und dieses schließlich durch Abtupfen mit einem Filtrierpapier entfernen, ehe man das Reagens einwirken läßt.

In manchen Fällen wird es am besten sein, die Kristalle zunächst zu isolieren. Man schüttelt dann nach Netolitzky[3]) das Pflanzenpulver zuerst mit Chloroform. Die Kristalle scheiden sich am Boden ab und können von dem oben schwimmenden Pulver im Scheidetrichter oder Spitzglas getrennt werden. Durch Wiederholung dieses Verfahrens und durch Benützung spezifisch schwererer oder leichterer Flüssigkeiten (Bromoform, Tetrachlorkohlenstoff u. a.) kann man dann die abgesetzten Kristalle von fremden Bestandteilen reinigen. Bei spezifisch sehr schweren Pulvern ist es nötig, schon für die erste Trennung eine Flüssigkeit von größerem spezifischem Gewicht zu nehmen.

In den Membranen der Acetabularien kommt neben kohlensaurem Kalk auch oxalsaurer Kalk vor, der nach Behandlung mit verdünnter Essigsäure in

---

[1]) Raphiden werden manchmal schwer durch Jodsäure angegriffen.

[2]) W. Plahl, Zum Nachweis der Oxalate in Pflanzengeweben, Zeitsch. wiss. Mikrosk., 1920, XXXVII, S. 130.

[3]) Netolitzky, l. c. S. 26,2; auch Biochem. Zeitschr., XCIII, S. 226.

größeren Körnern („sphärolithische Bildungen") zurückbleibt (Leitgeb[1])). In Lupinus albus (Samen) soll gelöstes Kalziumoxalat in loser Bindung mit freier Oxalsäure und mit Zitronensäure vorkommen (Belzung)[2]).

Magnesiumoxalat (Brechungsindices des Monohydrats: $\alpha=1{,}375$, $\beta=1{,}525$) kommt nach Monteverde[3]) in den getrockneten Blättern vieler Paniceen vor. Bei Setaria viridis findet es sich auch in den lebenden Zellen. Es bildet unregelmäßige Aggregate oder stark doppelbrechende, radial gestreifte Sphärite und tritt überwiegend in der Epidermis, seltener im Mesophyll auf. Die Kristalle lösen sich schwer in Wasser, sind unlöslich in Essigsäure, löslich in Salzsäure (ohne Gasentwicklung), in Schwefelsäure (ohne Bildung von Gipskristallen), in Salpetersäure; nach Behandlung mit Kalilauge verlieren sie Doppelbrechung und Streifung und werden löslich in Essigsäure, mit Gipslösung geben sie Kristalle von Kalziumoxalat und bei Einwirkung einer ammoniakalischen Lösung von Chlorammonium und Natriumphosphat entstehen die charakteristischen Kristalle von Ammoniummagnesiumphosphat. — In Piper nigrum (Perikarp) finden sich Kristalle von Magnesiumoxalat, die in Kalilauge braun, in Chloralhydrat farblos erscheinen (W. Plahl, Arch. f. Ch. u. Mikr., 1912, V, S. 320), ebenso nach demselben Autor in Nelken.

Zum Nachweis der im Zellsaft **gelösten** oxalsauren Salze stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Überwiegend wird es sich um das saure Kaliumsalz handeln. Dieses läßt sich in Rumex-, Rheum- und Oxalis-Arten, vornehmlich in frischem Material aus dem Monat Mai ohne weiteres durch Eintrocknen der Präparate auf dem Objektträger zur Kristallisation bringen und nach Borodin prüfen (bei Zusatz einer gesättigten wässerigen Lösung von saurem oxalsaurem Kali Zunahme der Ausscheidung). Nach Knoll[4]) führen die ausgeschiedenen Tropfen der Fruchtkörper von Agaricaceen ebenfalls ein Kaliumsalz der Oxalsäure. Bei Atropa belladonna scheint das Vorkommen des Kaliumsalzes sehr vom Boden abhängig zu sein, im Juni war es im Blatte nicht nachweisbar. Natronsalze treten in Salsola und Salicornia auf.

[1]) H. Leitgeb, Die Inkrustationen der Membran von Acetabularia, Sitzgsber. Wiener Akad., 1887, XCVI l, S. 15.

[2]) E. Belzung, Sur l'existence de l'oxalate de calcium a l'état dissous, Journ. de Bot., 1894, VIII, S. 213.

[3]) N. A. Monteverde, Über die Ablagerung von Kalzium- und Magnesiumoxalat in der Pflanze, Bot. Centralbl., 1890, XLIII, S. 327.

[4]) F. Knoll, Über die Abscheidung von Flüssigkeit an und in den Fruchtkörpern verschiedener Hymenomyceten, Ber. d. bot. Ges., 1912, XXX. Gen.-Vers. Heft, S. 43.

Schimper[1]) benutzte zum Nachweis Uranylazetat. Ist die Menge an gelösten Oxalaten in den Präparaten nicht zu gering, dann bilden sich rhombische Kristalle von Uranoxalat. Die größeren Kristalle erscheinen gelb und leuchten im polarisierten Lichte stark auf.

Man kann ferner die gelösten Oxalate in den Präparaten durch Zusatz von Kalziumnitratlösung in Kalziumoxalat überführen und dieses dann in bekannter Weise mikrochemisch identifizieren. Auch Kalziumchloridlösung (1+3) läßt sich zur Erzielung von Kalziumoxalat verwenden. Doch durchdringt die Lösung schwer das Gewebe, auch erscheinen die Kristalle nicht in den Zellen, sondern meist auf den Präparaten. Um Kalziumoxalat in den Zellen zu erhalten, legte Gießler[2]) größere Pflanzenstücke in eine kochende, konzentrierte Kalziumchloridlösung. Steht eine Luftpumpe zur Verfügung, dann kann man mit Vorteil die Kalziumchloridlösung unter der Luftpumpe injizieren. Die auf diese Weise behandelten Pflanzenteile werden ausgewaschen und aus ihnen die Präparate hergestellt. Die Präparate zeigen nun die Oxalsäure als feinkörniges Kalziumoxalat, seltener kommt es zur Bildung von Sphäriten. Die Fällungen treten besonders deutlich bei Heranziehung von Vergleichspräparaten nicht behandelter Pflanzen hervor. Mit dieser Methode hat Gießler die größte Menge von gelösten Oxalaten in den peripheren Teilen der Organe nachgewiesen. Die unterirdischen Achsen enthielten nur wenig. Mikrochemische Reaktionen zur Identifizierung der Niederschläge (mit Essigsäure, Salzsäure, Schwefelsäure) sind hier ebenfalls erforderlich, denn auch Gerbstoffe werden als grauschwarze Massen niedergeschlagen und können Anlaß zur Verwechslung mit feinkörnigem Kalziumoxalat geben. Daher ist Aufhellen mit Chloralhydrat und polarisiertes Licht heranzuziehen. Zitronensaure Salze werden gleichfalls mitgefällt, das entstandene Kalkzitrat ist löslich in Essigsäure.

In Milchsäften scheinen gelöste Oxalate öfters vorzukommen (Convolvulus tricolor, Keimlinge, Czapek[3]), Apocynum cannabinum, Wurzel, Tunmann)[4]). Kocht man Präparate einige Minuten mit Wasser auf, dann scheiden sich kleine oktaëderförmige Kristalle von Kalziumoxalat ab. Diese bilden sich nicht, wenn man den Milchsaft oder die Parenchym-

---

[1]) A. F. W. Schimper, Z. Frage der Assimilation der Mineralsalze durch die grüne Pflanze, Flora, 1890, LXXIII, S. 215.

[2]) R. Gießler, Die Lokalisation der Oxalsäure in der Pflanze, Jenaer Zeitschr. f. Naturwiss., 1893, N. F. XX, S. 344.

[3]) Fr. Czapek, Zur Kenntnis des Milchsaftsystems der Convolvulaceen. Sitzgsber. Wien. Akad., 1894, CIII, 1, Sep. S. 13.

[4]) O. Tunmann, Radix Apocyni cannabini, Pharm. Centralh., 1908, XLIX, S. 304.

zellen für sich kocht. Mit Kalziumchlorid ist Oxalat im Milchsaft, mit Schwefelsäure Kalzium im Parenchym nachweisbar. Die Oxalsäure stammt somit aus dem Milchsafte, das Kalzium aus dem Parenchym.

Zum Nachweis gelöster Oxalate verwendet Patschovsky[1]) ihre Reaktion mit Ferrosulfat, die Bildung von Ferrooxalat $FeC_2O_4 + 2\,H_2O$. Es sind kleine rhombische blaßgelblichgrüne Prismen mit einer domatischen Endigung oder Täfelchen. Sie sind dichroitisch (farblos-sattgelb).

Man legt entweder die nicht zu dünnen Schnitte in eine 10proz. mit Essigsäure versetzte Ferrosulfatlösung und verdrängt die Luft durch Erwärmen (nicht unbedingt erforderlich) oder — was vorzuziehen — man taucht die zu prüfenden Pflanzenteile in das heiße Reagens oder injiziert es mit der Luftpumpe.

Da Gerbstoff durch das Reagens blau oder grün wird, so läßt sich dieser gleichzeitig nachweisen.

Das Patschovskysche Verfahren ist nach Micynski[2]) zum Nachweis von löslichem Oxalat bei Gegenwart von Kalkoxalat ungeeignet, da sich dieses mit Ferrosulfat umsetzt.

Molisch[3]) verwendet zum Nachweis gelöster Oxalate noch folgende Fällungsmittel:

Gesättigte weingeistige (96proz. oder 90proz. Weingeist) Natronlauge. Es entsteht sofort ein weißer kristallinischer Niederschlag aus Nädelchen, Doppelpinseln, Sternen und Dendriten. Der Niederschlag muß, wenn er für Oxalsäure beweisend sein soll, spätestens innerhalb einer Stunde entstehen, er darf nicht mit Scheibchen oder abgerundeten sechseckigen Plättchen verwechselt werden, die mit dem Reagens in den gelösten kalkreichen Zellen entstehen.

Gesättigte weingeistige Kalilauge läßt federige und treppenrandige Spieße, Rauten, vierkantige Prismen und Aggregate von diesen entstehen.

Bleiazetat ruft einen Niederschlag hervor, dessen Aussehen von der Konzentration des Reagens abhängig ist. Mit 2proz. Lösung entstehen sofort Nädelchen oder aus verzweigten Dendriten bestehende Sterne, die nach einigen Stunden in relativ große rhombische prismatische oder briefkouvertähnliche Kristalle übergehen.

Baryumchlorid erzeugt in 5—20proz. Lösung in Schnitten von Pflanzen, die reich an gelösten Oxalaten sind, zigarrenartige, längs-

[1]) l. c. S. 219, 2.

[2]) K. Micynski, Bull. acad. polon. Krakau, 1923, Math. nat. Kl., Ser. B. 217, nach Bot. Centralbl., 1924, IV, S. 378.

[3]) l. c. S. 219, 1.

gestrichelte Formen, an den Enden schiefbegrenzte schmale Prismen, Sterne, Warzen, Doppelpinsel von solchen und schollige unregelmäßig begrenzte Aggregate.

Über die Eigenschaften des Nitronoxalats s. S. 137.

Apfelsäure

Apfelsäure (Monoxybernsteinsäure), 1785 von Scheele entdeckt, bildet Kristallaggregate (F. 100°) oder eine hygroskopische Masse. Leicht in Wasser und Weingeist löslich, schwer in Äther. Geht beim Erhitzen über Fumarsäure und Maleinsäure in Maleinsäureanhydrid über.

Sie ist mit Sicherheit nachgewiesen in Sorbus aucuparia (Früchte), Solanum tuberosum (Knollen), Artemisia absinthium (Kraut), Pirus domestica (Frucht), Cerasus caproniana (Frucht), Fraxinus excelsior (Blätter), Chelidonium majus (Kraut), Beta vulgaris (Rübe), Hippophae rhamnoides (Frucht), Rheum officinale (Stengel), Acer saccharinum (Blutungssaft), Ribes rubrum (Frucht), Oxylobium parviflorum (Kraut), Prunus avium (Frucht), Echeveria secunda glauca (Blätter).

Apfelsäure ist wahrscheinlich nachgewiesen in: Geranium zonale (Blätter), Rhus coriaria (Früchte), Sempervivum tectorum (Blätter), Nicotiana tabacum (Blätter), Rheum palmatum und undulatum (Stengel und Blätter), Prunus spinosa (Früchte), Prunus cerasus (Früchte), Bryophyllum calycinum (Blätter), Euphorbia resinifera (Michsaft), Opuntia versicolor (Blätter), (Franzen u. Keyßner)[1].

Nach Klein und Werner kommt Apfelsäure noch vor in Capparis javanica (Blatt und Blattstiel), Nicotiana rustica (Blatt), Bryophyllum crenatum (Blatt), Opuntia vulgaris (Stamm), Sedum fabaria (Blatt), Sempervivum tectorum (Blatt), Rheum undulatum (Blattstiel), Atropa belladonna (Frucht), Berberis integerrima (Fruchtfleisch), Berberis sanquisolenta und vulgaris (Fruchtfleisch), Mespilus germanica (Fruchtfleisch), Pirus malus (Fruchtfleisch), Pirus spectabilis (Fruchtfleisch), Prunus spinosa (Frucht), Rubus idaeus und Oestii (Frucht), Solanum lycopersicum (Frucht).

Bei den Sukkulenten erfolgt in der Nacht vermehrte Bildung und Anhäufung von Apfelsäure. Warburg bringt diese Vorgänge mit der Chlorophylltätigkeit in Beziehung, Czapek schreibt ihnen „die ökologische Bedeutung zu, den Gaswechsel bei Xerophyten möglichst sparsam und nutzbringend zu gestalten". Nach Euler[2]) entsteht sie bei der Veratmung von Kohlenhydraten.

Über den Nachweis der Apfelsäure in Geweben s. S. 217.

Der Nachweis der Lokalisation ist schwierig. Über die Apfelsäure der Crassulaceen gibt Brenner[3]) nur an, daß sich „in allen Zellen sehr

[1]) H. Franzen u. E. Keyßner, Kritisches über das Vorkommen der Apfelsäure in den Pflanzen, Biochem. Zeitschr., 1923, CXXXV, S. 183.

[2]) H. Euler, Zur Kenntnis der Assimilationsvorgänge, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1909, LIX, S. 122.

[3]) W. Brenner, Untersuchungen an einigen Fettpflanzen, Basler Dissert., 1900, S. 9.

leicht ein lösliches Kalksalz, offenbar saurer apfelsaurer Kalk, in großer Menge nachweisen läßt" (Schwefelsäure, Oxalsäure), sowie daß sich beim Zusatz von Salpeterlösung „vor der eigentlichen Plasmolyse innerhalb der Vakuolenflüssigkeit die gelösten Salze zu einem stark lichtbrechenden Tropfen oder Klumpen" ansammeln, der mit Schwefelsäure Gipskristalle liefert. Derartige Angaben sprechen nur für einen Kalkgehalt der betreffenden wasserlöslichen Verbindungen und können zu Irrtümern Anlaß geben, selbst dann, wenn makro-chemisch für die zu untersuchenden Pflanzen die Anwesenheit von Apfelsäure erwiesen ist.

In den Präparaten werden die Kristalle nach dem Borodinschen Verfahren geprüft, wobei zu erinnern ist, daß sowohl saure als neutrale Salze vorliegen können. Kristalle von neutralem apfelsauren Kalk

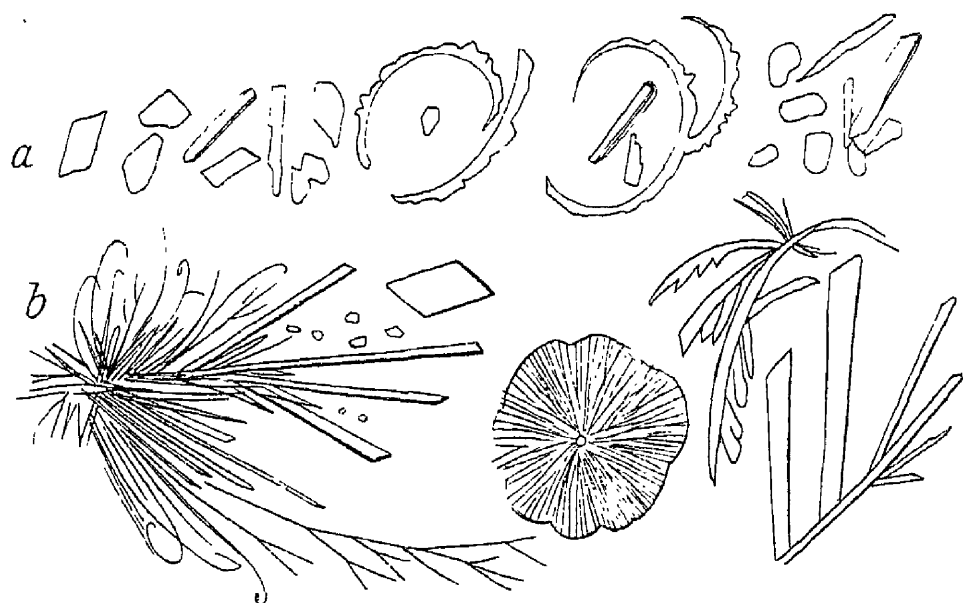



Fig. 49. Maleinsäure und Maleinsäureanhydrid im Sublimat *a*) von Sorbus aucuparia (Frucht), *b*) von Euphorbium (Droge) (Tunmann)

werden bei Zusatz einer gesättigten wässerigen Lösung von neutralem apfelsaurem Kalk wachsen und sich bei Zusatz einer wässerigen Lösung von saurem apfelsaurem Kalk, weinsaurem Kalk u. dgl. auflösen.

Die neutralen Alkalisalze kristallisieren selbst aus reinen Lösungen nur langsam aus, die sauren Salze kristallisieren leichter und sind luftbeständig. Meist wird es sich um das saure Kalziummalat handeln, das in kaltem Wasser schwer löslich ist (1 : 78) und zuweilen in, allerdings schlecht ausgebildeten, rhombischen Oktaëdern in Glyzerinpräparaten erscheint. Das neutrale Kalksalz ist leichter in Wasser löslich und bildet feine Blättchen oder in lockeren Sphärokristallen angeordnete Nadeln. Apfelsaures Magnesium kristallisiert in rhombischen Säulen. Außerdem lassen sich apfelsaure Salze in neutraler Lösung mit Silbernitrat nachweisen. Es entstehen Sphärokristalle von Silbermalat, die

sich in Ammoniak leicht auflösen und sich beim Eintrocknen der Lösung wieder als Kristallwarzen ausscheiden[1]). Freie Apfelsäure fällt hierbei hauptsächlich in vier- oder achteckigen Blättchen aus.

Sowohl bei Milchsäften, Auszügen als auch bei Schnitten kommt ferner die Mikrosublimation in Betracht. Apfelsäure gibt bekanntlich ein Sublimat, das aus Maleinsäure (prismatische Kristalle mit schiefen Endflächen, die Gipskristallen ähneln) und aus Maleinsäureanhydrid (rhombische Täfelchen) besteht. Bei der Sublimation von Euphorbium (Handelsdroge) gelangen im Sublimat nach 24 Stunden Zerrformen von Maleinsäure und -anhydrid zur Ausscheidung (Tunmann)[2]). Bei Benutzung reichlicher Substanzmengen (0,01 g) sind die Kristalle makroskopisch sichtbar als filzartiger dichter Rasen, der wie eingetrocknetes Chloralhydrat aussieht. Die Maleinsäure gelangt dabei auch in Sphärokristallen zur Kristallisation (Fig. 49b). Bei den Crassulaceen muß man ein größeres Blattstück (1 qcm) zur Sublimation bringen, von dem man zuvor vorteilhaft die Kutikula, resp. die Epidermis, abgezogen hat. Die Kristalle bilden sich auch hier erst nach mehreren Stunden; es sind meist federförmige Kristallskelette, die zu „Sternen und Sonnen" vereinigt sind. Auch Weingeistmaterial kann benutzt werden. Ein gutes Versuchsobjekt ist Sorbus aucuparia (Fig. 49a). Zur Sublimation ist eine höhere Temperatur erforderlich. Die Spaltlinge der Apfelsäure gehen erst über, wenn der Schnitt im Verkohlen ist und schwarz wird!

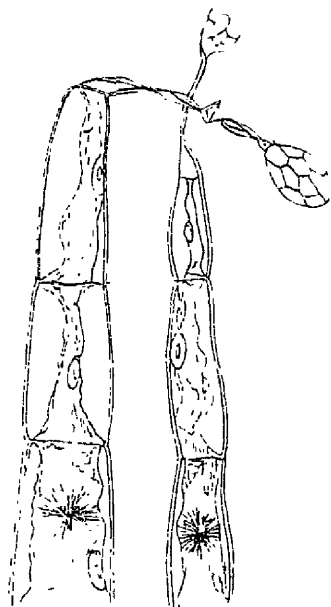



Fig. 50. Malatsphärite in Nicotiana tabacum (Trichome), getrocknetes Material in Alkohol (Tunmann)

Die in den getrockneten Tabakblättern beim Einlegen in Weingeist sich ausscheidenden Sphärite (Fig. 50), die in lebenden Blättern nicht zugegen sind, lassen sich durch Essigsäure sichtbar machen (Schimper)[3]), lösen sich langsam in Wasser und in Mineralsäuren, sind unlöslich in Weingeist, Äther, Glyzerin, blähen sich beim Verkohlen auf und sind jedenfalls ein apfelsaures Salz (Molisch, Histochemie, S. 38). In der Tat erhalten wir bei der Sublimation der mit Essigsäure aufgehellten und mit Weingeist ausgewaschenen Blätter typische Kristalle von Malein-

[1]) K. Haushofer, Mikr. Reakt., S. 67.

[2]) O. Tunmann, Vgl. Unters. über die Mikrosublimationsmethoden, Apoth.-Ztg., 1912, XXVII, S. 494.

[3]) A. F. W. Schimper, Anleitung zur mikroskopischen Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel, 1888.

säureanhydrid (Tunmann, Apoth.-Ztg. 1912, S. 973). Auch die Kalziummalate des Birkensaftes (Betula lenta) sind in kaltem Weingeist schwer löslich[1]. Diels[2], der die Zersetzung der Chloride in Halophyten verfolgte, fand in den von ihm untersuchten Pflanzen ebenfalls Apfelsäure und Dębski[3] deutet den braunen Niederschlag, den Bleiazetat in Blättern und Blattstielen der Marantaceen erzeugt, auf diese Säure. Über die Sphärite, die durch 70proz. Weingeist in kaktusähnlichen Euphorbien (Belzung) und in Equisetum (Tunmann) entstehen und die möglicherweise Kalziummalophosphat sind, s. S. 150.

Fumarsäure[4]

Fumarsäure bildet kleine Nadeln oder Blättchen F. 286—287° im geschlossenen Röhrchen. Schwer in kaltem Wasser löslich, leicht in Weingeist und Äther. Geht beim Erhitzen über 200° in Maleinsäureanhydrid über.

Fumarsäure ist nachgewiesen in Boletus igniarius, Boletus scaber, Agaricus-Arten, Cetraria islandica, Corydalis bulbosa und Fumaria

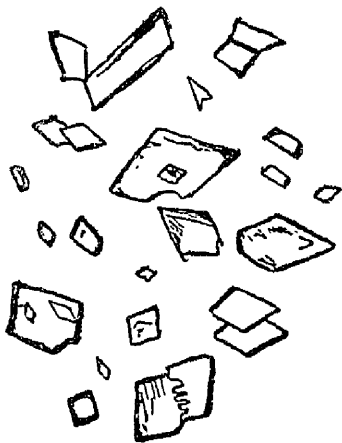



Fig. 51. Kadmiumfumarat (Wagenaar)

Fig. 52. Natrium- oder Ammonium-Uranylfumarat (Wagenaar)

officinalis. Tunmann glaubt Kristalle von Fumarsäure in den ersten Sublimaten unreifer Sorbus-Früchte angetroffen zu haben. Man kann in der Tat durch vorsichtige Sublimation Fumarsäure in Nadeln subli-

[1]) W. Lenz, Über Birkensaft, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1909, XIX, S. 323.

[2]) L. Diels, Stoffwechsel und Struktur der Halophyten, Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXII, S. 309.

[3]) B. Dębski, Über den Bau und den Bewegungsmechanismus der Blätter der Marantaceen, Anzeiger d. Krakauer Akad., 1895, S. 244.

[4]) M. Wagenaar, Bijdrage tot de microchemische onderscheiding tusschen Maleine- en Fumarzuur, Pharmaceut. Weekblad, 1927, LXIV, S. 6.

mieren. Löst man das Sublimat in einem Tropfen Ammoniak, so kann man durch Zusatz von Salz- oder Schwefelsäure die freie Säure wieder ausscheiden. Weiter eignen sich zum Nachweis der Fumarsäure das Bleisalz, das Kadmiumsalz (Fig. 51) und das Natrium- oder Ammonium-Uranylfumarat (Fig. 52). Letzteres erhält man in hexagonalen Blättchen und Säulen, wenn man die Lösung eines Fumarats mit Uranylnitrat und einem Ammonium- oder Natriumsalz versetzt.

Weinsäure

Weinsäure bildet monokline Säuren F. 168—170°. Leicht in Wasser und Weingeist löslich, schwer in Äther.

Weinsäure ist nachgewiesen in Vitis vinifera (Früchte), Tamarindus indica (Früchte), Beta vulgaris (unreife Zuckerrübe), Acer saccharinum (Blutungssaft),

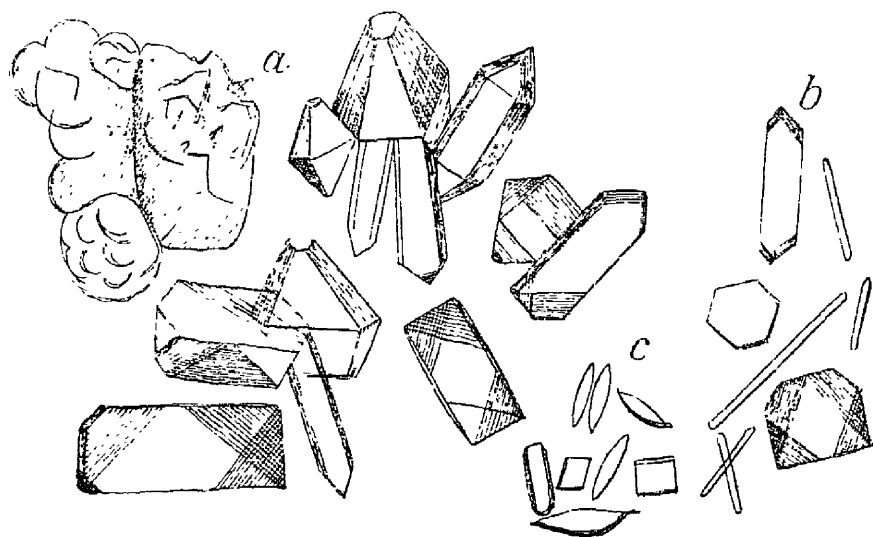



Fig. 53. *a*) Isolierter Weinsteinballen aus dem Fruchtfleisch der Korinthe (links oben), der mit Kalziumchlorid typische Kristalle von Kalziumtartrat bildet und *b*) mit verd. Kalilauge Kristalle liefert; *c*) Kristalle von Traubensäure (Kaliumsalz) (Tunmann)

Pirus aucuparia (Früchte), wahrscheinlich kommt sie auch im Holz von Quercus pedunculata vor[1]).

Nach Klein u. Werner kommt Weinsäure noch vor im Blatt von Vitis vinifera, im Fruchtfleisch von Berberis integerrima, in der Frucht von Solanum lycopersicum.

Saures Kaliumtartrat scheidet sich, meist gemengt mit Kalziumtartrat als Weinstein bei Wasserentzug (Weingeistmaterial, getrocknete Pflanzen) in undeutlich kristallinischen Schollen, Klumpen und Krusten ab, die unlöslich in Äther sind. Die Weinsteinklumpen in Drogen und Herbarmaterial, die oft makroskopisch sichtbar sind und eine Freipräparation gestatten (Korinthen), sind nicht einheitlicher Natur, worauf

---

[1]) H. Franzen u. Fr. Helwert, Kritisches über das Vorkommen von Weinsäure in den Pflanzen, Biochem. Zeitschr., 1923, CXXXVI, S. 291.

die Beobachtung der Lösungvorgänge im polarisierten Lichte hinweist. Es werden vielmehr schlecht ausgebildete Weinsteinkristalle durch Zucker, Pektine, Schleime u. a. untereinander verkittet (Fig. 53a). Auch neutrale und saure Kalziumtartrate (erstere in Blättern von Vitis, letztere in Früchten von Rhus typhina), die sich sehr wenig in Wasser, leicht in 10 proz. Kali- und Natronlauge lösen, sowie Aluminiumtartrate (Lycopodium clavatum) treten auf. Das neutrale Kaliumtartrat löst sich leicht in Wasser, das saure Salz ist unter Deckglas nur bei größerem Wasserzusatz nach längerer Zeit in Lösung zu bringen. Kristallausscheidungen von neutralem Kalziumtartrat, die ebenfalls dem rhombischen System angehören, wurden von Schimper[1]) (l. c. S. 238) in vergilbten Blättern und Blattstielen von Vitis und Ampelopsis aufgefunden und eingehend studiert. Sie lösen sich kaum in Wasser, sofort in 10proz. Kalilauge, sowie in 2—3proz. Essigsäure. In konzentrierter Essigsäure sind sie unlöslich. Hat man somit die Kristalle in verdünnter Essigsäure gelöst, dann erfolgt bei Zusatz von konzentrierter Säure wiederum ein Auskristallisieren von Kalziumtartrat. Beim Glühen gehen die Kristalle in schaumige Massen über, die sich in 10proz. Essigsäure leicht lösen.

Der mikroskopische Nachweis der Weinsäure wird vorteilhaft mit essigsaurem Kalium oder mit Chlorkalzium geführt (Schimper[1])). Statt des letzteren empfiehlt sich Kalziumazetat. Die Präparate dürfen zuvor nicht gewässert sein. Sie kommen auf dem Objektträger in einen kleinen Tropfen Wasser, werden durchmustert, um eventuell bereits vorhandene Ausscheidungen festzustellen; man läßt eintrocknen. Alsdann fügt man eine wässerige Lösung von essigsaurem Kalium (1 : 10) zu. Es bilden sich nach einigen Minuten rhombisch-hemiëdrische Kristalle von saurem Kaliumtartrat, die in Essigsäure löslich sind. In vielen Fällen gelingt ferner die Reaktion mit wässeriger Kalziumchloridlösung (1 : 10). Es bilden sich charakteristische Kristalle von Kalziumtartrat (Kombinationen von langgestrecktem Prisma und Doma u. a.), die sich leicht in verdünnter (2proz.), schwer in konzentrierter Essigsäure lösen. Zur Diagnose von saurem Kaliumtartrat ist diese Reaktion sehr geeignet; kocht man Weinsteinausscheidungen mit Kalziumchlorid unter Deckglas auf, dann gehen sie in die charakteristischen über 100 μ großen Kristalle von Kalziumtartrat über (Fig. 53a); auch wenn größere Mengen Kalziumtartrat im Weinstein zugegen sein sollten, so erscheinen diese erst nach der Reaktion in typischer Form.

Behandelt man Schnitte mit Weinsteinballen mit Kalilauge, so scheiden sich nach einigen Stunden Kristalle des Kalisalzes in typischer

[1]) A. F. W. Schimper, Zur Frage der Assimilation der Mineralsalze d. d. grüne Pflanze, Flora 1890, LXXIII, S. 220.

Form aus, daneben aber auch kurze Nadeln (Fig. 53 b). Ähnliche Kristalle erhält man durch Aufkochen der Schnitte in Wasser und nachfolgenden Zusatz von Weingeist.

Hatte man Schnitte mit Weinsteinballen und Wasser länger aufgekocht, bis etwa die Hälfte des Wassers unter dem Deckglase verdampfte, und der noch heißen Lösung Weingeist zugefügt, dann wird man nach 10—12 Stunden und teilweiser Verdunstung regelmäßig kleine Kristalle von traubensaurem Kalium antreffen (Fig. 53 c). Es sind teils flache Täfelchen, teils Kristalle von Wetzsteinform, die Diatomeen nicht unähnlich sind. Letztere Formen sind für die Traubensäure typisch.

Als Hilfsreaktionen zum Nachweis der Weinsäure können dienen: Silbernitrat (kleine, wenig charakteristische Täfelchen, zuweilen knie-

Fig. 54. Kalziumtartrat aus Tamarindenmus durch Kalziumazetat (Großglauser)

förmig verwachsen), konz. Kaliumdichromat (gibt im Gegensatz zur Zitronensäure schwarze Färbung; in Früchten und Blättern, überhaupt im Gewebe des Gerbstoffes wegen nicht anwendbar), sowie Erhitzen mit Resorcinschwefelsäure (1 : 100, violettrote Färbung, die auch einzelne Kohlenhydrate ähnlich geben). Im Gewebe nur mit Vorsicht zu benützen.

Zum Nachweis von Weinsäure in Tamarindenmus[1]) verreibt man ein wenig des Muses auf dem Objektträger mit Wasser, zieht den wässerigen Auszug mit einem Glasstab ab und setzt dann einige Körnchen

[1]) L. Rosenthaler, Chemische Charakterisierung von Drogen, Pharmac. Act. Helv., 1926, I, S. 72.

von Kalziumazetat hinzu. Das entstehende Kalziumtartrat bildet zunächst Kugeln, dann Sphärokristalle. In diesem Zustand kann es verbleiben; es kann aber auch noch in rhombische Oktaëder übergehen (Fig. 54).

Zitronensäure

Zitronensäure (Scheele 1784). Rhombische Prismen. F. (wasserfrei) 153 bis 154°. Leicht löslich in Wasser und Weingeist, schwerer in Äther.

Die Verbreitung der Zitronensäure ist keine so allgemeine, wie man früher annahm.

Sicher ist das Vorkommen der Zitronensäure[1]) in folgenden Pflanzen: Pirus malus (Stammrinde), Richardsonia scabra (Kraut und Wurzel), Vitis vinifera (Blutungssaft), Prunus cerasus (Blätter), Lupinensamen, Saccharum officinarum (Saft des Rohrs), Vaccinium oxycoccos (Frucht), Rubia tinctorum (Wurzel), Chelidonium majus (Kraut), Pisum sativum (Samen), Vicia sativa (Samen), Vicia faba (Samen), Sorbus aucuparia (Früchte), Citrus aurantium (Frucht), Ribes rubrum (Frucht), Prunus avium (Frucht).

Wahrscheinlich kommt Zitronensäure noch vor in Nicotiana tabacum (Blätter) Morus nigra (unreife Frucht), Adansonia digitata (Frucht).

Nach Klein und Werner kommt Zitronensäure weiter vor: In Penicillium sp., alte Kultur, Agapanthus umbellatus (Blatt), Arum italicum (Frucht), Atropa belladonna (Frucht), Citrus limonum (Fruchtfleisch), Mespilus germanica (Fruchtfleisch), Pirus malus (Fruchtfleisch), Rubus idaeus (Frucht), Rubus Oestii (Frucht), Solanum lycopersicum (Frucht).

Eine Anzahl Pilze (Citromyces, Penicillium luteum) bilden in Kultur auf kreidehaltiger Zuckerlösung Kalziumzitrat.

Wehmer[2]) erhielt bei der Kultur von verschiedenen Pilzen in kreidehaltiger Zuckerlösung Kalziumzitrat, welches beim Erwärmen in Form von Sphäriten und Raphiden ausfiel.

Bei Aspergillus niger ist Zitronensäure im allgemeinen ein Zwischenprodukt beim Abbau von Zuckern zwischen diesen und Oxalsäure. Bei einzelnen Pilzrassen unterbleibt der Abbau zu Oxalsäure, so daß die Zitronensäure erhalten bleibt[3]).

In Weingeistmaterial und in Schnitten, die längere Zeit in Glyzerin oder in Wasser lagen, finden sich zuweilen (nicht immer) Abscheidungen von Kalkzitraten[4]). Mit Kalziumchlorid lassen sich analoge Fällungen in Schnitten hervorrufen, aber nur bei Gegenwart größerer Mengen Zitronensäure. Es ist ratsam, die Schnitte zuvor mit etwas verdünnter

[1]) H. Franzen u. Fr. Helwert, Kritisches über das Vorkommen von Zitronensäure in grünen Pflanzen, Biochem. Zeitschr., 1923, CXXXV, S. 384.

[2]) C. Wehmer, Charakteristik des zitronensauren Kalkes, Ber. deutsch. bot. Ges., 1893, XI, S. 333.

[3]) C. Wehmer, Oxalsäure- und Zitronensäure-Entstehung in ihrer gegenseitigen Beziehung bei verschiedenen Rassen des Pilzes Aspergillus niger, Ber. deutsch. chem. Ges., 1924, LVII, S. 1659.

[4]) E. Belzung, Journ. de Bot., 1891, V, S. 25.

Natronlauge zu versetzen. Die Fällung entsteht erst beim Kochen, ist aber wenig charakteristisch. Die für neutrales Kalkzitrat charakteristische Wetzsteinform erhält man nur selten. Das Kalkzitrat unterscheidet sich nun von den gleichzeitig mitgefällten Oxalaten durch seine Löslichkeit in Essigsäure, von den Kalksalzen anderer organischer Säuren durch seine Unlöslichkeit in Wasser (Malate [nicht alle s. S. 231]. Tartrate lösen sich nach wiederholtem Durchsaugen von Wasser).

Von den zahlreichen Reaktionen, die man zum Nachweis der Zitronensäure kennt, kommen weder die einfachen Kristallfällungen, die Behrens empfahl (als Silber-, Wismut-, Kupfersalz) noch die Überführung in andere Stoffe (azetondikarbonsaures Quecksilber, Pentabromazeton, Pentajodazeton, Jodoform) noch die Farbenreaktionen für den Nachweis im Gewebe in Betracht.

Fig. 55. Sublimat reiner Zitronensäure (Citraconsäureanhydrid) links. Sublimat des Fruchtfleisches der Zitrone, rechts; durch die mitgerissenen Wasserdämpfe ist das Anhydrid überwiegend in Citraconsäure übergegangen (Tunmann)

Überall dort, wo der Gehalt an Zitronensäure ein hoher ist, wird man die direkte Sublimation heranziehen können (Tunmann[1]) s. a. S. 217. Ein kleiner Schnitt aus dem Fruchtfleisch der Zitronen gibt mehrere Sublimate. Gewöhnlich sind am Rande der Sublimate federartige Kristallskelette und „bastfaserartige“ Formen mit abgerundeten Endflächen von Citraconsäureanhydrid, wie diese im Sublimat von reiner Zitronensäure zugegen sind. Bei der Sublimation lebender Pflanzenteile werden aber Wasserdämpfe mitgerissen, wodurch das Anhydrid überwiegend in Citraconsäure übergeht. Dieses bildet gut entwickelte Einzelkristalle (bis 40 μ), die meist an Magnesiumammoniumphosphat (Sargdeckelform) erinnern, aber auch als monokline Blättchen ausgebildet sind. Letztere könnte man leicht für Itaconsäure halten, was sie aber nicht sind, da sie sich sehr leicht in Äther lösen (Fig. 55).

[1]) O. Tunmann, Vgl. Untersuchungen über die Mikrosublimationsmethoden, Apoth. Ztg., 1912, XXVII, Nr. 52—54 u. 99.

Agaricinsäure

Agaricinsäure, eine dreibasische Oxysäure[1]) kommt zu 14—16 % in den Fruchtträgern von Polyporus officinalis Fries vor. Sie ist in Chloroform, Benzol und Wasser unlöslich, schmilzt bei 142° und bildet perlmutterglänzende Blättchen.

Über die Mikrochemie und die Lokalisation der Agaricinsäure berichtete Tunmann[2]). Wenn man etwas Agaricinsäure des Handels unter Deckglas in einem Tropfen Wasser erwärmt, dann löst sie sich unter Schaumbildung klar auf, und beim Erkalten scheidet sich eine zähe gelatinöse Masse ab, in der Tropfen suspendiert sind, die allmählich kristallinische Beschaffenheit annehmen. Kocht man sie unter Deckglas mit wässerigem Chloralhydrat, so kristallisieren aus der Lösung federförmige, manchmal gebogene Nadeln, seltener entstehen zierliche Nadelsterne. Kocht man nun ein Präparat aus den inneren Gewebepartien des Hutes mit Chloralhydrat und kühlt schnell ab, so wird das „Harz" in eine hyaline Masse übergeführt, aus der sich nach etwa 10 Minuten die gleichen Kristalle abscheiden. Bei vorangegangenem Zusatz von verdünnter Salzsäure fallen die Kristalle zarter und mehr baumartig gruppiert aus. Die Kristalle entstehen auch, wenn die Präparate vorher mit kaltem Wasser, mit Äther, Petroläther, Chloroform oder Benzol während einer Woche bei öfterem Umschütteln mazeriert wurden. Andererseits bleibt die Kristallbildung aus, wenn man die Präparate vorher mit Wasser aufkocht und auswäscht oder sie längere Zeit mit 50proz. Weingeist, Ammoniak oder weingeistiger Kalilauge behandelt hat. Aus diesen Löslichkeitsverhältnissen geht hervor

Fig. 56. Polyporus officinalis, a) Randschicht des Fruchtträgers mit Kristallen agaricinsaurer Salze; b) Agaricinsäure des Handels oder aus dem Gewebe mit Chloralhydrat zur Kristallisation gebracht; c) ebenso erhaltene Kristalle des γ-Harzes(?) (Tunmann)

[1]) H. Thoms u. J. Vogelsang, Zur Kenntnis der Agaricinsäure, Pharm. Centralh., 1907, XLVIII, S. 804, dort die chem. Lit.

[2]) O. Tunmann, Über die Bildung des Harzes, den mikrochemischen Nachweis der Harzsäuren und über die Kristalle in Polyporus officinalis Fries, Schw. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1909, XLVII, Nr. 11.

daß es sich um Agaricinsäure handelt, die sich mit Chloralhydrat mikrochemisch leicht nachweisen läßt. Das Chloral wirkt hier als Kristallisationsmittel. Die Reaktion spricht dafür, daß hier die Agaricinsäure in freiem Zustande auftritt (Fig. 56b).

Außer und neben der Agaricinsäure finden sich Sphärokristalle bei der Chloralhydrateinwirkung vor. In Präparaten aus dem Inneren des Hutes finden sie sich nur spärlich, in solchen der Randschicht treten sie dagegen zahlreich auf, namentlich wenn man die rotbraunen Partien prüft (Fig. 56c). Da nun die Agaricinkristalle sich bei längerem Liegen in 90proz. Weingeist, besonders bei gelindem Erwärmen lösen, die Sphärokristalle aber hierbei unlöslich zurückbleiben, so läßt sich, gestützt auf die makrochemischen Ermittelungen Schmieders, annehmen, daß diese Sphärokristalle das γ-Harz darstellen, welches demnach in größeren Mengen in der Randschicht auftritt, während die Agaricinsäure in den weißen inneren Teilen des Hutes lokalisiert ist. Letztere gibt mit Kupferazetat eine tiefgrüne, makroskopisch bereits sichtbare, Farbenreaktion. Die Färbung des „Harzes" von Polyporus officinalis mit Kupferazetat kommt daher der Agaricinsäure zu. In der Randschicht des Hutes (Droge) finden sich Kristalle, die oft in regelmäßigen Reihen abgelagert sind; die großen sind bis 215 μ groß und entweder würfelförmige Gebilde, die sich aus Lamellen aufbauen, oder Drusen. Die kleinen Kristalle messen nur 8—32 μ, meist 10—15 μ (Fig. 56a). Den Reaktionen und Lösungsverhältnissen zufolge handelt es sich um Magnesium- und Kaliumverbindungen der Agaricinsäure.

Erhitzt man kleine Schnitte oder eine Spur Pulver von Fungus laricis mit einem Tropfen 10proz. Sodalösung, so scheiden sich kleine, nur wenige μ große Kristallnadeln aus, die wie kleine Bakterien aussehen und nach einiger Zeit (stets über Nacht) sich zu kleinen Drusen vereinigen.

Durch Sublimation erhält man Tropfen, die beim Eintrocknen kristallisieren. Die Kristalle leuchten im polarisierten Licht lebhaft in allen Farben. Die großen Kristalle löschen parallel zur Längsachse aus. Die Sublimate enthalten Methyl-Hexadecylmaleinsäureanhydrid und geben gleich diesem folgende Reaktionen: 1. Erwärmt man mit Chlorzinkjod, so scheiden sich aus der Lösung bald farblose Tropfen aus, die schnell gelb und allmählich braunrot werden. Nach einigen Minuten bilden sich in allen Tropfen Sphärite feiner Nadeln. Nach einer Stunde werden die Kristalle grau, dann graugrün, schließlich zuweilen blau. 2. Erwärmt man mit Sudan III (0,1 g, 5 g Glyzerin, 5 g Weingeist), so entstehen farblose Tropfen, die beim Erkalten der Flüssigkeit in erst farblose, später schiefergraue, schließlich deutlich grasgrüne Sphärite übergehen. Durch längere Einwirkung von Ammo-

niak auf Methyl-Hexadecylmaleinsäureanhydrid bilden sich myelinartige Formen (Tunmann[1]).

Sorbinsäure[2])

Die Sorbinsäure wurde in reinem Zustande 1859 von A. W. Hofmann aus dem Safte der Früchte von Sorbus aucuparia isoliert.

Nadeln F. 143°. Schwer in Wasser löslich, leicht in Weingeist.

Zum Nachweis kann die Sublimation dienen. Vorteilhaft verwendet man frische (noch wasserhaltige) Schnitte völlig reifer, roter Früchte von Sorbus aucuparia und sublimiert bei 5 cm hoher Flamme. Nach 4—5 Minuten erhält man ungemein typisch ausgebildete Kristalle (Fig. 57 a). Auch die Blättchen, die an Asparaginkristalle erinnern, sind charakteristisch. (Reine Sorbinsäure, mit einem kleinen Tropfen Wasser bedeckt, gibt bei der Sublimation die gleichen Kristalle). Die in der reifen Frucht neben Sorbinsäure vorkommenden Stoffe, Sorbin und Sorbit, geben keine kristallinischen Sublimate. Bei Benutzung trockener Früchte erhält man zum Teil abweichende Kristallformen, da bei Wassermangel teilweise Zersetzung der Säure erfolgt. Ist die Frucht nicht völlig reif, dann findet man in den Sublimaten Maleinsäure, um so mehr, je gelber und unreifer die Frucht ist. Maleinsäureanhydrid bildet die gleichen Täfelchen wie Sorbinsäure, löst sich aber sofort in Wasser und Essigsäure und gibt mit Silbernitrat nur Tröpfchen. Die Kristalle der Sorbinsäure des Sublimates lösen sich leicht in Weingeist, aber unter Deckglas in Wasser, Chlorzinkjod und Jodjodkalium erst beim Kochen. Aus heißem Wasser kristallisiert sie zum Teil in Drusen und Sphäriten. Ferrichlorid löst und färbt innerhalb einer Stunde nicht. Die folgenden beiden Reaktionen hat Tunmann als diagnostisch brauchbar befunden. Silbernitrat führt den Kristall sofort in feine Nädelchen über, schließlich entstehen kleine Drusen und

Fig. 57. Sorbus aucuparia. *a*) Sorbinsäurekristalle im Sublimat der reifen Frucht; *b*) Maleinsäure im Sublimat der unreifen Frucht; *c*) Sorbinsäurekristall bei Einwirkung von Silbernitrat (Tunmann)

[1]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie von Fungus laricis, Apoth. Ztg., 1914, XXIX, S. 120,

[2]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie und Mikrosublimation einiger Methanderivate, Apothek. Ztg., 1912, XXVII, S. 974.

Sphärite; der Umriß des ursprünglichen Kristalles bleibt mehrere Stunden erhalten (Fig. 57c). Gesättigte Brombromkaliumlösung (s. Alkaloidreagens) verwandelt den Kristall sofort in tief braungelbe, ölige, glänzende Tropfen. Von Fettsäuren, die auch in Sublimaten auftreten können (s. d.), unterscheidet sich die Sorbinsäure dadurch, daß sie sich in Kalilauge-Ammoniak löst (keine Verseifungsprodukte).

Veratrumsäure[1]

Veratrumsäure tritt als Spaltprodukt von Sabadilla-Alkaloiden und Pseudoakonitin auf; ob sie frei im Sabadillsamen vorkommt, ist unsicher. Doch erhält man sie daraus durch Mikrosublimation.

Aus heißem Wasser, in dem Veratrumsäure gut löslich, scheidet sie sich (mit 1 Mol. Kristallwasser) als Prismen F. 181° ab. Leicht löslich in Weingeist und Äther. Mit Ferrichlorid Gelbfärbung. Sublimiert bei über 300°. Das Sublimat besteht aus rhombischen, manchmal mit Nadeln vermischten Kristallen. Mit Bromwasser im Überschuß gibt es Nadeln von Dibromveratrol (Mikroschmelzpunkt 79—83°). Die weingeistige Lösung des Sublimats gibt mit konzentrierter Schwefelsäure bäumchenartige Kristalle, auf Zusatz von 2proz. Kalziumchloridlösung zu Lösungen von Veratrumsäure entsteht eine Fällung von Kristalldrusen.

Mekonsäure

In Papaver somniferum (Opium) und Papaver Rhoeas.

Tafeln oder Blättchen. F. (nach Trocknen bei 100°) 150°. Leicht löslich in heißem Wasser, heißem Weingeist, Methanol und Essigäther, schwer in kaltem Wasser und Weingeist, Äther und Amylalkohol.

Gibt mit Ferrisalzen eine blutrote Färbung.

Um Mekonsäure im Opium nachzuweisen, verreibt man ein wenig mit Wasser und legt in den Brei ein Körnchen Ferrisulfat oder Ferriammoniumsulfat. Das Körnchen umgibt sich mit einer roten Zone.

Tunmann[2]) gibt folgende mikrochemische Reaktionen für Mekonsäure an:

Mit Silbernitrat sofort gelblichweißer käsiger Niederschlag. Er besteht aus feinen Nadeln, die teils einzeln liegen, teils sternförmige Gruppen bilden. Die kleinen Sphärite zeigen im polarisierten Licht das dunkle Kreuz, die größeren Kristallgruppen leuchten in Grau und Graubraun. Auslöschung der freiliegenden Kristalle parallel zur Längsachse.

[1]) G. Klein, E. Herndlhofer u. O. Tröthandl, Der mikrochemische Nachweis der Sabadilla-Alkaloide, Österr. bot. Zeitschr., 1928, LXXVII, S. 111.

[2]) O. Tunmann, Der Nachweis des Opiums mit Hilfe des Mekonins und der Mekonsäure, Apoth.-Ztg., 1916, XXXI, S. 499.

Gibt man zu einem Tropfen Mekonsäure-Lösung einige Körnchen Ferrum sulfuricum siccum und erwärmt, nachdem sie sich gelöst haben, über kleiner Flamme, so entstehen wenn man weiter eintrocknen läßt, in 5—10 Minuten in der Nähe der Randzone rotbraune Sphärite, nach innen zu überwiegend rotbraune Einzelkristalle, die zu Büscheln und Garben auswachsen. An der Spitze der letzteren bilden sich Drusen, so daß Zwillingsdrusen entstehen, die durch die Längsachsen der Nadeln verbunden sind. Alle Kristalle leuchten im polarisierten Licht feuerrot. Die Einzelkristalle, Büschel und Garben lassen einen kräftigen Pleochroismus bis zum fahlen Gelb erkennen.

Fette und Lipoide

Die Fette im engeren Sinne bestehen überwiegend aus Fettsäureestern des Glyzerins. Doch können auch freie Fettsäuren vorhanden sein. Ein fast nie fehlender Nebenbestandteil der Fette sind Sterine. Stoffe, die ohne Fette im engeren Sinne zu sein, sich in vielen Eigenschaften ähnlich wie Fette verhalten, sollte man als Lipoide bezeichnen; zu ihnen gehört beispielsweise das Lezithin, das bei der Hydrolyse außer Fettsäuren und Glyzerin Cholin und Phosphorsäure liefert. Nicht selten werden von den Mikroskopikern auch die echten Fette unter den Lipoiden verstanden. Da sehr viele Literaturangaben sich auf Lipoide in letzterem erweiterten Sinne beziehen, so sei auch hier diese Bezeichnungsweise angewandt, obgleich sie nicht völlig korrekt ist.

Dagegen sollte man Harze, ätherische Öle u. dgl., obgleich sie sich gegen Farbstoffe in der Regel wie Fette verhalten, nicht zu den Lipoiden rechnen.

Lipoide in erweitertem Sinne sind in geringer Menge wohl in jeder Zelle vorhanden.

Große Mengen von Fetten (50 % und mehr) finden sich in vielen Samen, auch in manchen Früchten und Skerotien. Beispielsweise enthalten nach eigenen Untersuchungen Arachissamen 40—50 %, Rizinuskerne 50—80 %, süße Mandeln 45—67 % Öl.

Nach A. Tschirch und seinen Schülern soll im Endosperm und den Kotyledonen ölhaltiger Samen eine eigenartige Verbindung aus Öl und einem plasmatischen Körper das sog. Ölplasma vorkommen[1]). Nach Policard und Mangenot[2]) existiert aber Tschirchs Ölplasma

[1]) B. Leiner, Untersuchungen über das Ölplasma und die Oleoplasten, Jahrbuch der philosoph. Fakultät II der Universität Bern, 1924, IV, S. 95.

[2]) A. Policard u. G. Mangenot, Recherches cytologiques sur l'état de l'huile dans les graines oléagineuses. La graine mûre. Compt. rend. Acad. sciences, Paris, 1923, CLXXVI, S. 1841.

nicht, sondern die Sache liegt folgendermaßen: Während im unreifen Samen das Öl in einer wässerigen Plasmalösung dispergiert ist, ist es im reifen umgekehrt. Im reifen Samen von Ricinus ist das Öl ein großer homogener Tropfen, in dem die Aleuronkörner suspendiert sind.

Besonders bemerkenswerte Vorkommen von Fett oder fettem Öl sind noch die folgenden: Fettes Öl als Ausscheidung auf der Frucht von Malus coriarius (coronaria Mill.?) (Molisch, Pohl), Ölüberzüge auf Blüten (Knoll, Kirchner, Pohl)[1], auf den Internodien der Blütenstände von Impatiens parviflora (v. Lingelsheim). Die Fadenknäuel in den Blattzellen des Mooses Fontinalis antipyretica bestehen nach Boresch[2]) in der Hauptmasse aus Fett. Die von Radlkofer und später von Fellerer in vielen Begonia-Arten aufgefundenen Sekretkugeln geben nach Neger[3]) mit verdünnter Kalilauge oder Ammoniak Myelinformen. Er schließt daraus, daß sie freie Fettsäuren, vermutlich in Fett gelöst, enthalten.

Dagegen ist es unsicher, ob die bei Oenotheraceen in Epidermiszellen des Blattes und Stengels vorkommenden Ölkugeln fettes oder ätherisches Öl sind[4]).

Die Fette zählen neben der Stärke zu den wichtigsten stickstofffreien Reservestoffen der Pflanze (in Pollen, Sporen, Zwiebeln, Knollen, Wurzeln, Samen, Früchten). Bei Diatomeen sind sie das erste sichtbare Assimilationsprodukt, werden bei kräftigem Wachstum sofort verbraucht und bei Wachstumshemmung gespeichert (Beijerinck). Geringe Mengen entstehen in Ölbildnern (s. d.), die Hauptmengen aber im Plasma (Wakker). Die Fetttropfen, oft noch von zarten mitgerissenen Plasmahäutchen umhüllt, sammeln sich später im Zellsaft an. Bei Naturhefen findet sie Henneberg in Vakuolen, bei Kulturhefen im Plasma verteilt, öfters um den Saftraum angehäuft. In sehr fettreichen, alten Samen trifft man zuweilen Fettkristalle an. Zur Fettbildung dienen Glykosen, Mannit u. a., hauptsächlich Stärke. Sowohl die Mobilmachung der Fette (beim Keimen) als auch ihre Bildung bei der Speicherung im Samen (S. Ivanow) wird durch Lipasen ausgeführt. Bei der Ölsynthese sind zuerst die freien Fettsäuren nachweisbar. Im Samen vertritt Fett die Stärke, schließt sie aber nicht aus. Fett und Stärke finden wir im Samen von Theobroma, Myristica, Laurus u. a. Das Fett des Fruchtfleisches (Cornus, Oleaceen, Palmen) dient auch als Anlockungsmittel für Tiere zur Verbreitung der

[1]) F. Pohl, Ölüberzüge verschiedener Pflanzenorgane, besonders der Blüte, Jahrbücher f. wiss. Bot., 1929, LXX, S. 565.

[2]) K. Boresch, Die Fettknäuel in den Blattzellen von Fontinalis antipyretica, Biochem. Zeitschr., 1920, CI, S. 110.

[3]) F. W. Neger, Neue Methoden und Ergebnisse der Mikrochemie der Pflanzen 2. Die Sekretkugeln in den Blättern und Blattstielen von Begoniaarten, Flora, 1923, CXVI, S. 324.

[4]) F. Stein, Über Ölkörper bei Oenotheraceen, Österr. bot. Zeitschr., 1915, LXV, S. 43.

Samen. (Eine Übersicht der Analysen der Samenfette findet sich in Czapeks Biochemie der Pflanzen). In den Stämmen einer Anzahl einheimischer Bäume (Fettbäume, weichholzig) geht im Oktober die Stärke mehr oder weniger vollständig in Fett über, dadurch soll eine Art Kälteschutz erreicht werden; Bäume, bei denen diese Umwandlung, die übrigens auch in den wintergrünen Blättern erfolgt, nicht vor sich geht, nennt A. Fischer Stärkebäume (hartholzig). F. Weber stellt den Kälteschutz in Abrede, Fett sei nur im Vergleich zur Stärke die beständigere Form des Reservestoffes. Den Übergang der Stärkekörner in Fetttropfen konnte A. Fischer in der feuchten Kammer (Fig. 3) mikroskopisch verfolgen; dabei fand keine Translokalisation statt. Doch vermögen Fette im fein emulgierten Zustande und als Seifen zu wandern (R. H. Schmidt). Eine Wanderung der Fette wurde mehrfach verneint, doch machen es Befunde von Tunmann bei Alkaloidstudien wahrscheinlich, daß Fette als Transportmittel dienen, besonders von (schädlichen) schwer diosmierbaren Stoffen.

Die mikrochemische Diagnose der Fette ist leicht in Geweben, in welchen größere Quantitäten an Fett zugegen sind, schwierig überall dort, wo, wie in den vegetativen Teilen, nur einige „fettglänzende" Tröpfchen zu identifizieren sind. Fallen bei diesen stark lichtbrechenden „Fetttröpfchen" die Reaktionen nur zum Teil positiv aus, so kann man nach Tunmanns Befunden auf Körpergemische schließen, die nur mehr oder weniger große Anteile von Fett enthalten. Die Diagnose stützt sich auf Ermittelung der Lösungsverhältnisse, auf Färbungen mit Fettfarbstoffen und mit Osmiumsäure, sowie auf Verseifung und Bildung von Myelin. Löslichkeitsverhältnisse und Färbungen sind Hilfsreaktionen; Verseifung und Myelinbildung, sowie Nachweis der Fettsäuren durch Sublimation sind Hauptreaktionen.

Zur Orientierung werden die Löslichkeitsverhältnisse[1]) geprüft. Die pflanzlichen Fette sind in der Regel löslich in Schwefelkohlenstoff, Äther, Petroläther, Chloroform, Benzol, Trichloräthylen u. dgl. Um brauchbare Ergebnisse zu erhalten, nimmt man die Reaktionen nicht nur unter Deckglas vor (mehrmaliges Durchsaugen des Reagens) unter gleichzeitiger mikroskopischer Beobachtung, sondern mazeriert die Schnitte in einem geschlossenen Glase 1—3 Tage. Um Fette aus Samen (starkwandigem Endosperm) zu entfernen, ist sogar

[1]) Etwas abweichend gegenüber den üblichen Fettlösungsmitteln verhalten sich Fette wie das Rizinusöl, die sich durch einen Gehalt an Oxyfettsäuren auszeichnen. So mischt sich Rizinusöl mit absolutem Alkohol und Essigsäure und ist in 3—4 Teilen Weingeist klarlöslich; es mischt sich dagegen nicht mit Petroläther in jedem Verhältnis. Bei den von Pohl (l. c.) beobachteten Ölüberzügen waren solche, die in 97 proz. Weingeist löslich, in Eisessig unlöslich waren, aber auch in Weingeist und Eisessig lösliche. Doch scheint es, daß es sich dabei teilweise um freie Fettsäuren handelte.

eine achttägige Mazeration angebracht. Von A. Meyer (Das Chlorophyllkorn, 1883) wurde zur Unterscheidung der Fette von gleichzeitig anwesenden ätherischen Ölen wässerige Choralhydratlösung (5 g Chloralhydrat, 2 g Wasser), sowie Eisessig empfohlen. Beim Durchsaugen der Reagentien unter Deckglas bleiben die meisten Fette ungelöst (eine Ausnahme bilden die Fette der Bakterien), während sich viele ätherische Öle lösen. Doch ist zu beachten, daß letztere in Drogen oft verharzt und dann in geringer Menge dieser Reagentien schwer löslich sind. Bei Drogen sind Harze häufig unter Deckglas völlig unlöslich in Chloralhydrat und in Eisessig. Auch die Löslichkeit der Fette in großen Mengen dieser Reagentien nimmt mit dem Alter der Pflanzenteile ab. So sind die eingetrockneten Fettmassen in den Sezernierungszellen mancher Epidermaldrüsen selbst bei längerem Erwärmen und bei mehrtägiger Mazeration in wässerigem Chloralhydrat unlöslich (in dem sich die Harze lösen), können aber durch weingeistige Chloralhydratlösung zum Lösen gebracht werden. Empfehlenswert ist zuweilen die Anfertigung einer größeren Anzahl von Präparaten in wässerigem und weingeistigem Chloral von steigender Konzentration, die luftdicht verschlossen (Deckglasumrandung) einer mehrtägigen Dauerbeobachtung unterworfen werden (Tunmann, Ber. pharm. Ges., 1908, XVIII, S. 503).

Fette sind unlöslich in kaltem und heißem Wasser und meist nahezu unlöslich in Weingeist. Doch werden vom absoluten Alkohol von vielen Fetten Spuren gelöst, von anderen Fetten größere Anteile, die bei der mikrochemischen Reaktion bereits ins Gewicht fallen. Leinöl wird zu 7%, Olivenöl zu fast 4%, Leindotteröl zu 7,8% gelöst und Rizinusöl und Krotonöl sind relativ leicht löslich in Weingeist. Es ist einleuchtend, daß kleine Tröpfchen, wie sie beispielsweise in den Blättern auftreten, leicht von absolutem Alkohol gelöst werden können, auch wenn sie echte Fette sind. Der Reaktion, bei der man auf die Beschaffenheit des Alkohols (absoluter, denn mit steigendem Wassergehalt sinkt die Löslichkeit der Fette) zu achten hat, kommt nur ein orientierender Wert zu.

Bei Gegenwart sehr geringer Fettmengen wird man die Beobachtung machen, daß als erste Phase der Einwirkung des Lösungsmittels die sehr kleinen Tröpfchen zu größeren Fetttropfen zusammenfließen, bevor sie in Lösung gehen. Diese Erscheinung ist allgemein für Fette typisch und erleichtert den Nachweis geringer Mengen. Um kleinste Fetttröpfchen der Fettsamen zu größeren zusammentreten zu lassen, legt Biedermann[1]) dünne Schnitte in Thymolwasser (be-

[1]) W. Biedermann, Über Wesen und Bedeutung der Protoplasmalipoide, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiologie, 1924, CCII, S. 223.

reitet durch Erhitzen von Thymol mit Wasser und Wiederabkühlen). Nach 1—2 Stunden treten dann Fetttropfen hervor, von denen vorher nichts zu sehen war.

Um kleinste Lipoidtröpfchen zu größeren zu vereinigen und gleichzeitig zur Färbung benutzte Czapek[1]) das „AP-Sudan": Mit der klaren Mischung von 8 Teilen destilliertem Wasser, 2 Teilen Amylenhydrat und 1 Teil Pyridin übergießt man festen Sudanfarbstoff im Reagenzglas, schüttelt gut durch, filtriert nach etwa 1 Stunde ab und bewahrt in gut schließendem Fläschchen auf.

Frische, vom anhängenden Wasser möglichst befreite Objekte kommen für 1 Stunde bei Zimmertemperatur in ein gut schließendes Fläschchen mit AP-Sudan, Schnitte werden ebenfalls direkt darin eingelegt. Aus der Farblösung bringt man die Präparate auf einige Minuten in destilliertes Wasser und beobachtet in Glyzerin.

In „Ölplasma" und Aleuronkörner enthaltenden Samen heben sich die ungefärbten Aleuronkörner scharf von dem tiefroten „Ölplasma" ab.

Färbungen der Fette mit den sog. Fettfarbstoffen[2]) sind seit langem in der Mikrochemie im Gebrauch. Sie färben aber auch Harze, ätherische Öle, verkorkte und kutinisierte Membranen. Um ein teilweises Auflösen der Fette bei der Färbung auszuschließen, darf der Weingeistgehalt der Farblösung 70 % nicht übersteigen. Als Waschflüssigkeit dient 50proz. Weingeist, außerdem Glyzerin, in dem auch beobachtet wird. Für sich allein sind die Farbenreaktionen nicht beweisend, zumal wir nicht wissen, ob sich andere Körper organischer Natur ebenfalls färben. Doch sind die Färbungen wichtige Hilfsreaktionen.

Es ist nun vielfach Brauch, aus den gefärbten Präparaten ohne weiteres Schlüsse zu ziehen. Die Färbungen sollen uns indessen in erster Linie auf die fraglichen Gebilde hinweisen, besonders kleinere Tröpfchen deutlicher hervortreten lassen. Es ist unerläßlich, an den gefärbten Präparaten die für Fette charakteristischen Löslichkeitsverhältnisse auszuproben, vornehmlich zu ermitteln, ob sich alle gefärbten Tropfen beim Durchsaugen von Chloralhydratlösung oder von Essigsäure nicht lösen. Lassen sich doch die Wirkungen der Lösungsmittel an gefärbten Präparaten weit klarer verfolgen als an ungefärbten.

[1]) F. Czapek, Zum Nachweis von Lipoiden in Pflanzenzellen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1919, XXXVII, S. 207.

[2]) Fettfarbstoffe sind indifferente fettlösliche Farbstoffe oder schwache Farbsäuren und Farbbasen. Die Fettfärbung ist ein physikalischer Lösungsvorgang; hierzu vgl.: Ph. Eisenberg, Über Fettfärbung, farbchemische und histologischtechnische Untersuchungen, Virchow Arch. 1910, CXCIX, S. 502.

Von den Farbstoffen haben sich Alkannin, Sudan III und Scharlach R am meisten eingeführt.

Alkannin: Der Farbstoff der Alkanna ist schon lange (s. Harze) ein beliebtes Tinktionsmittel. Zimmermann[1]) benutzte eine konzentrierte Lösung von Alkannin in absolutem Alkohol (durch mehrtägige Mazeration hergestellt), verdünnt diese mit dem gleichen Volumen Wasser und filtriert. Die Lösung ist haltbar. Die Schnitte werden über Nacht in einem geschlossenen Behälter in dem Reagens belassen. Fette, aber auch ätherische Öle, Harze, verkorkte und kutinisierte Membranen sind alsdann tiefrot gefärbt. Doch dürfen die Schnitte aus der Farblösung nicht direkt in Glyzerin oder Wasser übertragen werden, da hierbei das überschüssige Reagens sich teils in roten Tropfen ausscheidet und Irrtümer veranlaßt, teils durch amorphe Fällungen die Präparate unklar macht. Aus der Alkanninlösung gelangen die Schnitte zunächst in 50proz., dann in 30—40proz. Weingeist und werden nun erst in konzentriertem oder verdünntem Glyzerin untersucht.

Das in der tierischen Histologie von Daddi[2]) empfohlene und in neuerer Zeit viel gebrauchte Sudan III (Biebricher Scharlach) wurde in der botanischen Mikrochemie zuerst von Buscalioni[3]) benutzt zur Färbung von Harzen in Form einer weingeistigen Lösung (1 : 200). Der Farbstoff fand zum Fettnachweis in der tierischen Histologie Anwendung von Rosenthal[4]), wurde zur gleichen Zeit von Tunmann[5]) zur Differentialdiagnose von Harzen und Fetten bei den Sekretbehältern herangezogen. A. Meyer[6]) gebrauchte ihn zum Fettnachweis in Bakterien. Der Farbstoff kann in nachstehender Lösung angewandt werden: 0,1 g Sudan III, 10 g Alkohol, 10 g Glyzerin. Die Präparate bleiben auf 24 Stunden in der Farblösung, werden einige Stunden mit verdünntem Alkohol (50 %) ausgewaschen und in Glyzerin untersucht. Die Reaktion läßt sich auch unter dem Deckglas ausführen. Die Fette werden strohgelb bis rot (ebenso werden Harze, ätherische Öle, ver-

[1]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik, 1892, S. 69.

[2]) L. Daddi, Nouvelle méthode pour colorer la graisse dans les tissus, Arch. Ital. de Biol., 1896, XXVI, S. 142.

[3]) L. Buscalioni, Nuovo reatt. p. l'istol. veg., Malpighia, 1898, XII und: Sudan III und seine Verwendung in der botanischen Mikrotechnik, Bot. Centralbl., 1898, LXXVI, S. 398.

[4]) W. Rosenthal, Verhandl. d. d. Patholog. Ges., München, 1899, II, S. 440.

[5]) O. Tunmann, Über die Sekretdrüsen, Berner Dissert., Leipzig 1900, S. 11.

[6]) A. Meyer, Notiz über das Verhalten der Sporen und Fetttropfen der Bakterien gegen Eau de Javelle und gegen Chloralhydrat, Centralbl. f. Bakteriol., I. Abt., 1901, XXIX, S. 809.

korkte und kutinisierte Membranen gefärbt). Sind feste Fette oder Fettsäurekristalle zugegen (Drogen, Kakaosamen), so tritt die Färbung nur sehr langsam ein. Schwaches Erwärmen bis zur teilweisen Schmelzung der Fettmassen beschleunigt die Farbstoffaufnahme. Nach Rieder[1]) und Handwerck[2]) färben sich reine Palmitin- und Stearinsäure (Kahlbaum) bei gewöhnlicher Temperatur nicht mit Sudan, sondern erst beim Schmelzen (vgl. dazu S. 252).

Froboese und Spröhnle[3]) verwenden eine Sudanlösung in 70proz. Weingeist hergestellt durch Aufkochen bei Farbstoffüberschuß. Färbezeit 15—20 Minuten. Fällt diese Färbung nur schwach aus, dann verwendet man ein kurz vor der Färbung hergestelltes Gemisch von 20 ccm Farblösung und 2—3 ccm Wasser, bis leichte Trübung. Färbezeit 20 Minuten. Pohl streut Sudan-Körnchen in Öltropfen; die Körnchen lösen sich darin und färben sie gleichzeitig.

Zur Färbung von Fett in tierischen Geweben benützt Gross eine gesättigte Lösung von Scharlach R in einem Gemisch gleicher Teile Wasser und Diazetin[4]). Man bringt die Schnitte unmittelbar aus Wasser in die Farblösung, färbt etwa 10 Minuten im Paraffinofen oder Brutschrank, läßt abkühlen und bringt die Schnitte in Wasser, in dem sie unter Bewegung gründlich abgespült werden müssen.

W. Gross, Zur Technik der Fettfärbung, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1930, XLVII, S. 64.

Romeis hat gefunden, daß Scharlach R. und Sudan III Gemische sind. Im letzteren ist Sudanorange die eigentliche fettfärbende Komponente. Darstellung des Farbstoffes und der Lösung siehe Zeitschr. f. mikr.-anat. Forschung, 1929, XVI, S. 525 und Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., 1930, XLVII, S. 94.

Gleichzeitig mit Sudan kam Scharlach R (Fettponceau) in Aufnahme. Dieser Farbstoff färbt in 15—30 Minuten und wird als gesättigte Lösung in 70proz. Weingeist benutzt. Lagerheim[5]) empfahl ihn zum Nachweis fremder Fette in Schokoladen; bei tierischen Geweben wurde

[1]) H. Rieder, Über die Verwendbarkeit d. Farbstoffes Sudan III in der klinischen Mikroskopie, Deutsch. Arch. f. klin. Med., 1898, LIX.

[2]) C. Handwerck, Beiträge z. Kenntn. vom Verhalten der Fettkörper zu Osmiumsäure und zu Sudan, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1898, XV, S. 177.

[3]) C. Froboese und G. Spröhnle, Untersuchungen zur Theorie und Technik der Sudanfärbung, Zeitschr. mikr. anat. Forsch., 1928, XIV, S. 13.

[4]) Man mischt Diazetin mit gleichen Teilen Wasser, fügt Scharlach im Überschuß hinzu und löst bei 60°. Man filtriert vor dem Gebrauch die nötige Menge ab und kann nach dem Gebrauch die Farbstofflösung wieder in die Vorratsflasche zurückgießen.

[5]) G. Lagerheim, Technische Mitteilungen, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1897, XIV, S. 350 und: Über mikroskopische Untersuchungen von Kakao und Schokolade, Svensk. Farm. Tidskr., 1902, VI, Nr. 9. Es wird Scharlach R, in Milchsäure gelöst, benutzt und bei der Unterscheidung fremder Fette im Kakao nach

er von Michaelis[1]) und Herxheimer[2]) erprobt. Letzterer empfiehlt eine gesättigte Lösung in 70,0 absolutem Alkohol, 10,0 Wasser und 20,0 Natronlauge; die zerstörende Wirkung der Lauge wird durch den starken Alkohol aufgehalten. Bei pflanzlichen Objekten scheint diese Zusammensetzung noch nicht gebraucht zu sein. Sie müßte eine Aufhellung der Gewebe bewirken. Hingegen hat Tunmann in mit Scharlach gefärbten Präparaten sehr kleine Tröpfchen Fett, die der Beobachtung leicht entgangen wären, durch nachträglichen Zusatz von Schwefelsäure sichtbar gemacht. Die rötlichen Fetttröpfchen flossen zu blauen Kugeln zusammen, Scharlach löst sich nämlich in Schwefelsäure mit blauer Farbe. Die übrigen Farbstoffe haben sich nicht so allgemein eingebürgert, wie die eben genannten. Einige färben nicht nur Fette und ätherische Öle, Harze, verkorkte und kutinisierte Membranen, sondern auch noch andere Zellinhalte, zuweilen Tonerdekörper, selbst Zellkerne und Nukleinsubstanzen. Anderseits werden nicht alle Fette gefärbt. Überdies sind in vielen Fällen die erzielten Färbungen nicht genügend scharf und lassen verschiedene Deutungen und somit Verwechslungen zu. Hierher gehören Cyanin, Chlorophyllgrün[3]), Buttergelb, Fettblau, Meyers Gelb, Brasilin, Alizarin u. a. Trotzdem wird man diese Farben in speziellen Fällen mit Erfolg benutzen können. Das von Hell & Co. in Troppau in den Handel gebrachte Chlorophyllum purissimum (eine weingeistige Lösung) erwies sich bei einigen Versuchen recht brauchbar. Cyanin, von Ranvier[4]) zum Fettnachweis eingeführt, wird in 50proz. weingeistiger oder in 70proz. Alkohol-Azeton-Lösung benutzt. Die Lösung hält sich einige Zeit in braunem Glase. Die Schnitte kommen auf 24 Stunden in die Cyaninlösung (vor Licht geschützt!), werden mit 50proz. Weingeist ausgewaschen und in Glyzerin untersucht. Die Öltropfen im Mesophyll der Blätter werden nur grünlich, anderseits nach Hartwich und Uhlmann[5]) die Zellkerne im Perikarp von „Olea europaea schön

stattgehabtem Erhitzen der Erstarrungspunkt mit dem Polarisationsmikroskop beobachtet.

[1]) L. Michaelis, Deutsch. Med. Wochenschr., 1901, XXVII, Ref. in Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1901, XVIII, S. 313.

[2]) G. Herxheimer, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1902, XIX, S. 66. Dieser Autor empfiehlt ferner Indophenol in gesättigter Lösung in 70proz. Weingeist (Blaufärbung).

[3]) Vgl. dazu H. A. Arndt, Zum histologisch-färberischen Lipoidnachweis mit Chlorophyll, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1924, XLI, S. 481.

[4]) Ranvier, Technisches Lehrbuch der Histologie, Leipzig 1888, S. 97.

[5]) C. Hartwich und W. Uhlmann, Über den Nachweis fetter Öle durch mikrochemische Verseifung, Arch. d. Pharm., 1903, CCXLI, S. 111.

blau, das Öl nur grünlich". Hierzu muß bemerkt werden, daß selbst eine dreitägige Einwirkung der Cyaninlösung bessere Resultate nicht hervorruft. Von Orlean (Extr. Orlean. spir. spiss. Merck in Essigsäure gelöst) werden Fette gelblich gefärbt (Sonntag)[1]).

Sehr gerühmt, z. B. von Czapek, wird das Verfahren von Christeller[2]). Das mindestens 24 Stunden mit 10proz. Formalin fixierte tierische Material wird (auf dem Gefriermikrotom) geschnitten. Die Schnitte kommen nach kurzem Auswässern in eine 1proz. wässerige, filtrierte, frisch bereitete Lösung von Phenylhydrazinhydrochlorid, in welcher sie 24 Stunden oder länger bei 37° belassen werden, daraus auf eine Minute in eine 5proz. wässerige frischbereitete Lösung von Kaliumferricyanid. Tropft man auf den auf einen Objektträger gebrachten Schnitt konzentrierte Salzsäure, so färben sich die Fetttröpfchen intensiv himbeerrot, dann in wenigen Minuten dunkelkastanienbraun. Nach 24stündigem Wässern ist die Färbung haltbar. Man kann eine Kernfärbung mit Hämalaun oder dgl. anschließen. Einschließen in Glyzerin, Glyzeringelatine oder Apathyschen Sirup.

In Ermangelung anderer Farbstoffe mag wohl auch eine weingeistige Lösung von Paprikafarbstoff angewendet werden[3]).

In lebenden und fixierten Zellen läßt sich Fett mit der zuerst von A. Meyer[4]) für Fettnachweis in Bakterien empfohlenen „nadi"-Mischung nachweisen.[5]). Lösung A: 0,5 g Naphthol, 0,25—0,5 ccm 33proz. Kalilauge, Wasser zu 100 werden auf dem Dampfbad bis zur Lösung des Naphthols erwärmt. B: 0,5proz. Lösung von Dimethyl-p-phenylendiaminchlorhydrat. Man mischt unmittelbar vor Gebrauch mit 20 ccm Wasser je 0,25—2 ccm A und B und fügt zu 3 ccm Unter-

[1]) P. Sonntag, Der Orlean, ein neues Mittel zur Färbung der verkorkten und kutikularisierten Membranen, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1907, XXIV, S. 21.

[2]) E. Christeller, Centralbl. f. Allgem. Pathol. und pathol. Anatomie, 1916, XXVII, S. 385.

[3]) A. C. Ferrer, Ein neues Fettfärbemittel, Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1928, XLV, S. 249.

[4]) A. Meyer, Naphtholblau als Reagens für Bakterienfett, Centralbl. f. Bakt., 1904, Abt. I, XXXIV, S. 578.

[5]) J. Zweibaum, Sur la coloration des graisses dans la cellule vivante, Cpt. rend. soc. biol., 1923, LXXXIX, S. 254. — Derselbe, Sur l'utilisation du mélange „Nadi" et du bleu d'indophénol formé in vitro, en technique histologique (Coloration intravitale et postvitale des graisses), Compt. rend. soc. biol., 1923, LXXXIX, S. 256. — Derselbe u. G. Mangenot, Application a l'étude histochimique des végétaux d'une méthode permettant la coloration vitale et postvitale des graisses de la cellule animale, Compt. rend. soc. biol., 1923, LXXXIX, S. 540.

suchungsflüssigkeit 1—3 Tropfen des Gemisches[1]). Die optimale Konzentration zur Fettfärbung in lebenden Protisten ist 0,00014 bis 0,00057 %. Fett färbt sich blau, ätherisches Öl (Kompositen, Umbelliferen, Rutaceen) intensiv rosa bis veilchenblau, verkorkte und kutinisierte Membranen intensiv violett, verholzte ganz schwachblau. Die Fettfärbung hält sich nicht lange.

Zum Nachweis von freien Fettsäuren neben Neutralfett wird Nilblau-Hydrochlorid verwendet, das neutrale Fette rot, solche, die freie Fettsäuren enthalten, rotviolett oder blau färbt[2]).

Über das Verhalten von Nilblau und Sudan gegen Fettsäuren und Mischungen der Fettsäuren mit Neutralfetten (auch Cholesterin und Lezithin) haben Kaufmann und Lehmann[3]) Versuche angestellt. Sie fanden:

Gegen Sudan positiv: Kapronsäure, Myristinsäure, Cerotinsäure, alle ungesättigten Fettsäuren, die Triglyzeride und natürlichen Fette; gegen Sudan negativ: Laurinsäure, Stearinsäure, Palmitinsäure.

Gegen Nilblau positiv: Kapronsäure, Laurinsäure, die ungesättigten Fettsäuren mit Ausnahme von Sorbinsäure, ungesättigte Glyzeride und natürliche Fette; negativ: die gesättigten Triglyzeride, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Cerotinsäure.

Gegen Cholesterin und Lezithin auch im Gemisch mit Fettsäuren und Triglyzeriden ist Sudan (in Weingeist von 40 %) positiv. Nilblau läßt reines Cholesterin ungefärbt, ebenso reines Lezithin und dessen Mischungen mit Fettsäuren und Triglyzeriden und färbt ein Gemisch von Cholesterin und ungesättigtem Triglyzerid, nicht aber ein solches mit gesättigten oder freien Fettsäuren dunkelblau.

Vielfache Anwendung findet 1proz. Osmiumsäure, welche viele Fette braun bis schwarz färbt (infolge Reduktion). Gelindes Erwärmen beschleunigt die Reaktion. Die Färbung kann in kurzer Zeit durch Wasserstoffperoxyd und in einigen Stunden, wie Flemming[4]) zeigte, durch Terpentinöl, Xylol, Kreosot und Äther wieder aufgehoben werden.

[1]) Am besten sind die Reagentien nach 5—9 tägiger Aufbewahrung in dunklem kühlem Raum; die Mischung kann höchstens 3 Tage verwendet werden.

[2]) H. H. Escher, Grundlagen einer exakten Histochemie der Fettstoffe, Korrespondenzblatt f. Schweizer Ärzte, 1919, Nr. 43.

[3]) C. Kaufmann u. E. Lehmann, Kritische Untersuchungen über die Spezifitätsbreite histochemischer *Fettdifferenzierungsmethoden, Centralbl.* f. allg. Pathol. und pathol. Anat., 1926, XXXVII, S. 145.

[4]) W. Flemming, Weiteres über die Entfärbung osmierten Fettes in Terpentin und anderen Substanzen, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1889, VI, S. 178.

Äther kann aus praktischen Gründen hierzu nicht empfohlen werden. Nun reagiert Osmiumsäure in gleicher Weise mit ätherischen Ölen, Harzen, manchen Phenolen[1]) und Gerbstoffen. Letztere kann man mit Gerbstoffreagentien identifizieren, auch oft durch Mazerieren und Aufkochen mit Wasser entfernen. Doch sind nicht alle Körper, die wir unter der Bezeichnung „Gerbstoffe" vereinen, wasserlöslich. Es empfiehlt sich die mit Osmiumsäure gefärbten Schnitte mit Vanillinsalzsäure nachzubehandeln. Dann werden diejenigen Gerbstoffe, die Phloroglucinderivate sind, leuchtend rot. Schließlich kann man vor der Behandlung mit Osmiumsäure, die Gerbstoffe mit Eau de Javelle zerstören. Die Fette werden dadurch nicht angegriffen und reagieren mit Osmiumsäure.

Die ätherischen Öle hat man aus den mit Osmiumsäure behandelten Präparaten durch Kochen der Schnitte mit Wasser entfernen wollen, ein Verfahren, das nach Tunmanns Erfahrungen zwar häufig, aber nicht stets zum Ziele führt. Bei Drogen und getrockneten Pflanzen ist die Methode infolge teilweiser Verharzung der ätherischen Öle nicht zu benutzen und diese Verharzung erfolgt auch an lebendem Material sowohl beim Aufkochen mit Wasser, mehr noch bei längerer Aufbewahrung der Schnitte im Trockenschrank bei 100° und darüber. Zudem imprägnieren die verharzenden Terpene hierbei gerade die Fettmassen. Hingegen haben sich Wasserdämpfe zur Entfernung der ätherischen Öle (s. d.) aus Schnitten bewährt.

So ergibt sich denn folgender Gang: Die Schnitte werden nach der Behandlung mit Eau de Javelle (zur Entfernung der Gerbstoffe) Wasserdämpfen ausgesetzt und dann erst mit Osmiumsäure behandelt. Die Methode hat zur Voraussetzung Schnitte frischen (lebenden) Materials. Liegen Gemische von harzigen Balsamen, Schleimen oder ätherischen Ölen mit Fetten vor, so gestalten sich die Verhältnisse schwieriger. Doch geben in solchen Fällen die Lösungsverhältnisse an Vergleichspräparaten sowie die mikroskopischen Vergleiche, die eventuell durch genaue Zeichnungen mit dem Zeichenapparat zu unterstützen sind, Aufschluß.

Der Wert der Osmium-Reaktion auf Fette erfährt eine Einschränkung durch die Ergebnisse Altmanns, aus denen hervorgeht, daß nicht alle Fette mit Osmiumsäure reagieren[2]). Nur freie Ölsäure und Olein und wohl allgemein ungesättigte Fettsäuren und deren Glyzeride werden von Osmiumsäure geschwärzt. Nachfolgende Behandlung mit Alkohol

[1]) Mangenot fand in den Epidermiszellen des Blütenschaftes von Monotropa hypopitys in Vakuolen ein Osmiumsäure reduzierendes Phenol.

[2]) R. Altmann, Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen, I. Aufl., Leipzig 1890, S. 106 u. II. Aufl., 1894, S. 116.

kann zur Unterscheidung beider Substanzen dienen. Mit Osmiumsäure behandelte Ölsäure löst sich in Alkohol, mit Osmiumsäure behandeltes Olein ist unlöslich in Alkohol. Andererseits reagiert Osmiumsäure nicht mit Stearinsäure und mit Palmitinsäure und ihren Triglyzeriden. Nun kommen aber in den Pflanzenfetten Gemische der Glyzeride verschiedener Fettsäuren vor, so daß wir über die Wirkung des Reagens folgendes sagen können: Jedes Fett, das sich in den Geweben direkt mit Osmiumsäure schwärzt, enthält Glyzerid ungesättigter Fettsäuren, während die Fette, welche nur gelb oder braun werden, gesättigte Fettsäureglyzeride enthalten. Die schwache gelbe bis braune Färbung wird durch geringe Mengen an Ölsäure bewirkt. Derartige Fette werden durch Osmiumsäure schlecht fixiert und lösen sich infolgedessen leicht in ätherischen Ölen. Das braun gefärbte Fett kann bei Einwirkung von schwachem Alkohol eine schwarze Farbe annehmen.

Hiermit ist gleichzeitig ein reaktioneller Hinweis auf Lezithine[1]) gegeben (P. Mulon[2])), denn diese sind relativ arm an Ölsäure, werden also durch Osmiumsäure schlecht fixiert, nur braun gefärbt, erst bei nachfolgendem Alkoholzusatz schwarz und von ätherischen Ölen gelöst. Dadurch finden die Angaben von Neubauer[3]) Bestätigung, nach dem Osmiumsäure nur das Vorhandensein einer doppelten Bindung anzeigt. Überdies soll sich Lezithin im Gegensatz zu Fett nach Behandlung mit Chromatbeizen nicht mehr mit Osmiumsäure schwärzen[4]). Lezithine lösen sich (im Gegensatz zu den Fetten) nicht in Azeton (C. Deflandre, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1904, XXI, S. 47).

Über den Nachweis der Phosphorsäure der Lezithine s. S. 147.

Die Verseifungsmethode (Molisch)[5]) steht beim Nachweis der Fette an erster Stelle. Vielfach wird in der Literatur angegeben, daß

[1]) Die Lezithine sind Abbauprodukte der Phosphatide und kommen selbst in den Zellen nicht vor. Es sind fettartige Substanzen, die beim Kochen mit verdünnten Säuren oder Basen, sowie nach längerer Einwirkung von Oxalsäure in Fettsäuren, Glyzerinphosphorsäure und Cholin oder andere N-haltige Stoffe (Aminoäthylalkohol) zerfallen. Zum Nachweis werden die Schnitte mit Formalin gehärtet, mit Alaun gebeizt, mit Alkohol und Azeton gewaschen und schließlich mit Haematoxylin, Gentianaviolett oder Methylgrün gefärbt. Auf unserem Gebiete liegen hierüber eingehende Erfahrungen nicht vor.

[2]) P. Mulon, Action de l'acide osmique sur les graisses, Bibliogr. anat., 1904, XIII, S. 208.

[3]) Neubauer, Verh. d. 72. Vers. deutsch. Naturf. u. Ärzte, Karlsbad.

[4]) Colassak, zit. nach Czapek, Biochemie der Pflanzen.

[5]) H. Molisch, Grundriß einer Histochemie der pflanzlichen Genußmittel, Jena, 1891, S. 10.

es mit ihrer Hilfe gelingt, sämtliche Pflanzenfette im Gewebe mikrochemisch nachweisen zu können. Demgegenüber haben langjährige Untersuchungen immer wieder von neuem dargetan, daß die Methode beim Nachweis in der Zelle und bei kleinen Mengen zuweilen im Stich läßt, auch wenn das Reagens genügend lange eingewirkt hatte. Oft kommt man dann, wenn durchführbar, durch Isolierung der Fetttropfen zum Ziele. Die Reaktion wird nach Molisch mit Kalilauge-Ammoniak ausgeführt. Ätzkali wird zur Entfernung des Karbonats oberflächlich mit destilliertem Wasser abgespült, dann wird eine konzentrierte wässerige Lösung bereitet, die noch etwas Ätzkali ungelöst enthält. Diese Lösung wird mit dem gleichen Volumen 20proz. Ammoniakflüssigkeit gemischt. Das Reagens hält sich im braunen Glasstöpselglase einige Zeit. Ein Jahr alte Lösungen waren stets zu schwach geworden. Die Präparate werden trocken auf den Objektträger gelegt, mit einigen Tropfen Lauge bedeckt und das Deckglas aufgelegt. Da nun erfahrungsgemäß die Verseifung erst nach mehreren Stunden deutlich sichtbare Erfolge verursacht; so ist es ratsam, das Deckglas mit Wachs zu umranden; dadurch wird ein Verdunsten des Reagens verhindert und Karbonatausscheidungen, die zuweilen recht störend wirken können, werden möglichst vermieden.

Es ist nun unbedingtes Erfordernis, die Präparate einer Dauerbeobachtung von mehreren Tagen zu unterziehen. Viele irrtümliche Literaturangaben sind nach Tunmanns Befunden nur dadurch zu erklären, daß die Präparate nicht nach 1 bis 2 Tagen gründlich durchmustert wurden. Des weiteren ist polarisiertes Licht unbedingt erforderlich. Wir können an dem Öle eines Präparates verschiedene Erscheinungen feststellen (Elaeis, Amygdalus, Rizinus, Coffea u. a. wurden eingehend mit gleichem Ergebnis untersucht). Im gewöhnlichen Lichte sehen wir zunächst, daß die Tropfen zum Teil ihr Lichtbrechungsvermögen etwas einbüßen, zum Teil ein etwas schaumiges Aussehen erhalten. Alsdann erscheinen an der Peripherie der Tropfen feine hautartige Anhängsel, die man im Anfange ihrer Entstehung leicht für plasmatische Reste halten kann. Sie färben sich aber nicht mit Jod und der weitere Verfolg lehrt, daß in ihnen Anfangsstadien der Seifenkristalle vorliegen. Nach 1 Tage sind die Seifen deutlich ausgebildet; sie leuchten bei gekreuzten Nicols im allgemeinen nur wenig auf und sind dadurch von den lebhaft und farbig aufleuchtenden Kalikristallen leicht zu unterscheiden. Einige Tropfen sind ganz in Kristalle übergegangen, andere erscheinen ganz hyalin und ihr Umriß ist durch einen Kranz von Seifennadeln gekennzeichnet. Die zentrale Partie weiterer Tropfen besitzt noch starkes Lichtbrechungsvermögen und nur am Rande sind Kristalle. Die gebildete Seife hat den inneren Teil des

Tropfens vor der weiteren Wirkung der Lauge geschützt. Hier und da sind selbst bei völlig in der Ruhe belassenen Präparaten die Seifenkristalle durch Strömungen von den Tropfen fort und an fettfreie Stellen des Präparates geschwemmt (Fig. 58). Außerdem finden wir und zwar an dem gleichen Präparate Tropfen, die durch einen mehr oder weniger deutlichen Kreis eine Schale oder einen Hof erkennen lassen. Diese Tropfen zeigen in polarisiertem Lichte das bekannte dunkle Kreuz (besonders charakteristisch!), wodurch bei schwacher Vergrößerung leicht die Anwesenheit von Stärke vorgetäuscht wird. Doch ist eine Verwechslung mit Stärkekörnern bei Dauerbeobachtung ausgeschlossen Wirkung der Lauge). Nach 4—5 Tagen wird man nach Tropfen mit dem dunklen Kreuz vergeblich suchen. Sie haben inzwischen nur selten Seifenkristalle gebildet, sondern zeigen in den meisten Fällen am Rande Myelinformen (s. S. 257), die oft nur an einer Seite des Tropfens ausgebildet sind. Die Größe der Tropfen ist auf die verschiedenen Erscheinungen nur von geringem Einfluß. Da die Erscheinungen bei allen Objekten in gleicher Weise auftreten, so kann auch die chemische Zusammensetzung der Öle ebenfalls nicht die Ursache sein, weshalb nur bei einzelnen Tropfen Myelinbildung erfolgt.

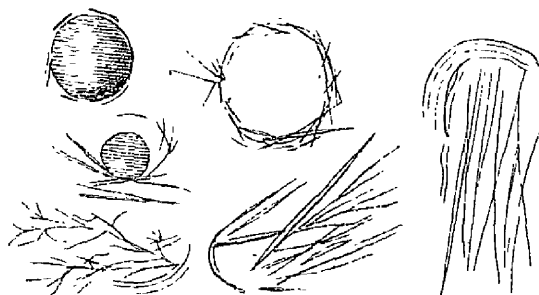



Fig. 58. Elaeis guineensis, Öltropfen, 20 Std. in Kalilauge-Ammoniak, die verschiedenen Stadien der Verseifung zeigend (Tunmann)

Nun gibt allerdings Kalilauge-Ammoniak auch mit anderen Substanzen kristallinische Reaktionsprodukte. Diese sind jedoch über das ganze Gesichtsfeld verteilt (Alkaloide) oder von gänzlich abweichenden Formen (Weinsäure). Überdies treten die Verseifungsprodukte erst nach mehreren Stunden, oft erst nach 1 Tage, klar hervor, während Alkaloide u. a. mit der starken Lauge schon in sehr kurzer Zeit reagieren. Zur Charakterisierung der Seifenkristalle kann es dienen, daß sie nach Verdunsten des Weingeists auf Zusatz einer Säure einen wasserunlöslichen Stoff — die Fettsäuren — geben. Natürlich würden sich die Salze jeder wasserunlöslichen Säure ebenso verhalten. Doch unterscheiden sich die Fettsäuren von den anderen Säuren dadurch, daß sie, wenn nicht schon bei der Abscheidung, so doch bei gelindem Erwärmen Tröpfchen bilden.

Ungleich rascher als mit dem Molischschen Verseifungsgemisch läßt sich die Verseifung mit gesättigten weingeistigen Laugen durchführen[1]).

[1]) L. Rosenthaler, Ein Beitrag zum mikrochemischen Nachweis von Ölen

Zu ihrer Darstellung wäscht man Stangen von Ätzkali oder Ätznatron mit wenig Wasser und dann nach Abgießen der wässerigen Flüssigkeit mit absolutem Alkohol. Von diesem gibt man dann soviel dazu, daß ein Teil des Ätzkalis ungelöst bleibt. Vom Ungelösten kann man abgießen oder man filtriert. Statt absoluten Alkohol kann man auch Methanol verwenden, um so mehr als die Lösungen dann weniger zur Braunfärbung neigen. Man bringt die Schnitte in einen Tropfen der Lösung und bedeckt sofort mit einem Deckglas (um Karbonatbildung zu vermeiden). In ölreichen Samen sind die entstandenen Seifenkristalle (Fig. 59) oder die als Vorformen auftretenden Fäden, die häufig radienförmig von einem Mittelpunkt ausgehen, in kürzester Zeit zu beobachten, besonders deutlich meist am Rand der Schnitte, woraus hervorgeht, daß die Reaktion nicht die Lokalisation anzeigt.

Fig. 59. Seifenkristalle aus Arachisöl mit konzentrierter weingeistiger Kalilauge

Aus dem Auftreten von Kristallen darf auch in diesem Fall nicht ohne weiteres auf das Vorhandensein von Fett geschlossen werden, da auch einige ätherische Öle und Balsame unter diesen Umständen Kristalle bilden.

Myelinbildung. Als Myelinformen (Virchow) bezeichnet man durch Einwirkung von Alkalien aus Fetttropfen entstandene, gewissermaßen herausgeschleuderte Gebilde, die die verschiedensten Formen besitzen (vgl. Fig. 60), schließlich Kugeln und Kränze abschnüren, im polarisierten Lichte aufleuchten und zu den flüssigen Kristallen zählen (Adami und Aschoff). Nach dem Eintrocknen resultieren sehr kleine, unvollkommen kristallinische Gebilde. Früher schrieb man die Fähigkeit, Myelinformen zu bilden, ausschließlich dem Cholesterin zu (Beneke), was von Köhler bezweifelt wurde. Nestler[1]) führt die Myelinbildung des Sekretes von Capsicum annuum auf Ölsäure zurück und

und Fetten, Schweiz. Apoth. Ztg., 1920, LVIII, S. 545, Über ein mikrochemisches Verseifungsverfahren, Mikrochemie, VIII, S. 72, 1930.

[1]) A. Nestler, Myelin- und Eiweißkristalle in der Frucht von Capsicum annuum, Sitzgsber. Wien. Akad., 1906, CXV, Abt. 1, S. 477.

Senft[1]) kam zu dem Ergebnis: „ohne Fettsäuren keine Myelinformen"; er erhielt sie wenigstens mit reiner Öl-, Leinöl-, Eruka-, Kaprin-, Kaprylsäure. Lezithine bilden schon mit Wasser Myelinformen[2]).

Die Myelinbildung innerhalb der Zelle gelingt nicht immer und nicht gut, die schönen Formen können in der engen Zelle gar nicht zur Entwicklung gelangen. Die Fette müssen isoliert werden. Vielfach (bei zarten Objekten, niederen Pflanzen, Sekretdrüsen) genügt ein Druck auf das Deckglas, um die Tropfen in Freiheit zu setzen[3]), bei stärkeren Präparaten ein Zerzupfen, bei Gegenwart größerer Mengen ein Herausheben mit der Nadel. Auf die isolierte Substanz läßt man 1—10proz. Ammoniak oder Kalilauge einwirken. Selbst saures phosphorsaures Natrium kann herangezogen werden (Senft). In anderen Fällen müssen starke Laugen benutzt werden (Salvia glutinosa), besonders bei Ge-

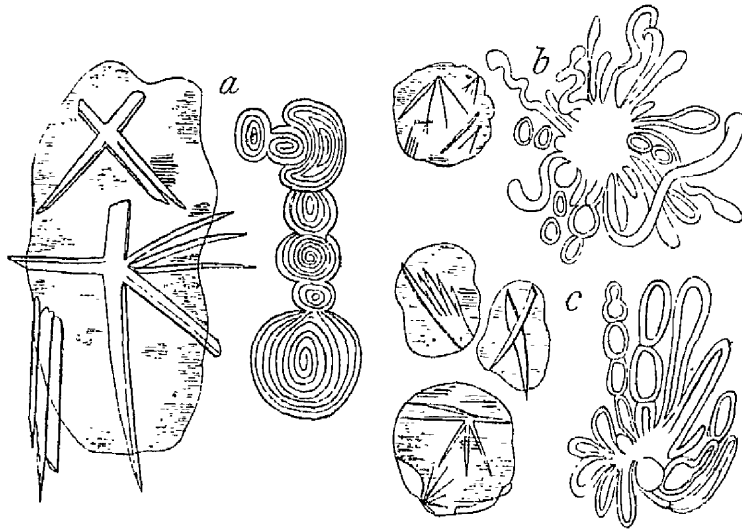



Fig. 60. Sublimationstropfen mit Fettsäurekristallen nebst zugehörigen Myelinformen, *a*) von Areca catechu, *b*) von Illicium religiosum, *c*) von Elaeis guineensis (Tunmann)

mischen; die Konzentration der Lauge muß daher von Fall zu Fall modifiziert werden. Die Myelinformen entstehen bald, oft sofort, sind mehrere Stunden beständig und werden beim Eintrocknen der Flüssigkeit undeutlich. Um sie einige Tage zu erhalten, werden die Reaktionen im ausgehöhlten Objektträger vorgenommen und die Deckgläser mit Vaselin luftdicht verschlossen. Die Myelinformen speichern Anilinfarbstoffe; vorteilhaft gebraucht man Ammoniak, das mit Safranin, Methylenblau u. a. gefärbt ist. Bei Zusatz von Essigsäure oder von konz. Kochsalzlösung ziehen sich die Formen ein oder ballen sich zu

[1]) Em. Senft, Über die Myelinformen bildende Substanz im Gingkosamen, Pharm. Post, 1907, XL, Sep.

[2]) L. Lednitrig, *Zur Verbreitung der myelinbildenden Stoffe im Pflanzenreich*, Pharmazeut. Presse, 1924, Folge 3.

[3]) A. Nestler, Das Sekret der Drüsenhaare der Gattung Cypripedium, Ber. deutsch. bot. Ges., 1908, XXV, S. 554.

Klumpen und Kugeln zusammen. Nun konnte aber Nestler bei Cocos nucifera und bei Elaeis guineensis weder mit den Präparaten noch mit dem Rückstand des Ätherauszuges Myelinformen erzielen. In derartigen Fällen muß man zur Sublimation greifen (Tunmann)[1]. Wie Fig. 60 zeigt, erhält man mit Schnitten von Elaeis, Cocos, Areca catechu, Illicium u. a. Sublimate, die aus Tropfen bestehen, die bei gekreuzten Nicols aufleuchten und aus denen sich nach wenigen Minuten schön ausgebildete Kristalle (Fettsäuren) ausscheiden[2]. Zuweilen erstarrt der ganze Tropfen zu einer kristallinischen Masse. Nun läßt sich feststellen, daß die Myelinformen in den Sublimaten zuerst aus den flüssig gebliebenen Anteilen der Tropfen entstehen und daß die Kristalle weit schwieriger zur Myelinbildung schreiten. Bedeckt man das Präparat mit dem Deckglase, dann lösen sich bei mehrfachem Durchsaugen von Petroläther die flüssigen Anteile auf, während die Kristalle nicht oder doch erst nach längerer Zeit etwas angegriffen werden. Die flüssigen Anteile stellen demnach die flüssigen ungesättigten Fettsäuren dar, bei ihnen erfolgt die Myelinbildung weit leichter als bei den kristallinischen Fettsäuren.

Wo mithin Myelinbildung an Fetten in den Präparaten oder im isolierten Zustande nicht gelingt, da greifen wir zur Sublimation. In den Sublimationstropfen gelingt die Myelinbildung stets, wobei es ohne Bedeutung ist, ob sich die Fettsäuren kristallinisch abscheiden oder nicht. Bei der Sublimation hat nicht nur gewissermaßen eine Reinigung der Fette von fremden Beimischungen, sondern vor allem eine mehr oder weniger vollständige Abspaltung von Fettsäuren stattgefunden, so daß die Alkalien leichter auf die für die Myelinbildung allein in Betracht kommenden Bestandteile der Fette, auf die Fettsäuren, einwirken können.

Allerdings geben nach Czapek[3] auch konz. Tanninlösungen Myelingebilde. Gerbstoffe können (Areca catechu) sowohl in den ersten

---

[1] O. Tunmann, Zur Mikrochemie der Arekanuß, Pharm. Post, 1911, XLIV, S. 703 und: Zur Mikrochemie und Mikrosublimation einiger Methanderivate, Apoth. Ztg., 1912, XXVI, S. 983.

[2] Abscheidungen von Kristallen in „fettartigen" Tropfen der Sublimate dürfen nicht ohne weiteres als Fettsäuren gedeutet werden, da sich Alkaloide an gleicher Stelle abscheiden. Die Fettsäurekristalle zeichnen sich jedoch durch ihre Größe, ihre typische Gestalt und ihr reaktionelles Verhalten aus. In den sublimierten Tropfen von Linum, Theobroma, Rizinus, Amygdalus (Schnitte der Samen) scheiden sich Kristalle meist nicht oder erst nach längerer Zeit aus; hingegen erstarren die Fettsäuren im Sublimat des Endosperms von Anamirta paniculata sofort kristallinisch (für diese Kristalle konnte L. Frank, Zeitschr. Nahr.- u. Genm., 1903, VI, S. 888, keine Deutung beibringen).

[3] Fr. Czapek, Über Fällungsreaktionen in lebenden Pflanzenzellen und einige Anwendungen derselben, Ber. deutsch. bot. Ges., 1910, XXVII, S. 147.

rein weißen als auch in den späteren, gelblichen Sublimaten zugegen sein. Sie werden durch Ferrichlorid braunschwarz und gehen beim Erwärmen in tiefschwarze Tropfen über. Beim Erwärmen werden die Fettsäuren geschmolzen, scheiden sich aber beim Erkalten (neben den schwarzen Gerbstofftropfen) wieder farblos, eventuell in kristallinischem Zustande, ab. Eine Verwechslung von Gerbstoff und Fettsäuren ist in den Sublimaten unmöglich.

Niethammer[1]) unterwirft fetthaltige Schnitte der Sublimation im Klein-Wernerschen Sublimationsapparat bei etwa 270—280° und erhält Fettsäuren enthaltende Sublimate, die sie zur Charakterisierung einzelner Fette verwendet.

Während wir mit Verseifung und Myelinbildung die Fettsäuren sicher nachweisen können, eventuell erst nach erfolgter Reinigung mittels Mikrosublimation, gelingt der Nachweis des **Glyzerins** in Schnitten nicht. Bei der Mikrosublimation tritt bei höherer Temperatur zuweilen Akroleingeruch auf; es hat eine Zersetzung stattgefunden. Man erhält dann im Sublimat (falls die Dämpfe nicht gänzlich entwichen sind) mit Anilin einen amorphen braunen Niederschlag und kann auch nach Behrens[2]) prüfen mit einer wässerigen Lösung von salzsaurem p-Nitrophenylhydrazin, die mit einem Tropfen Essigsäure angesäuert ist (orangefarbene Sternchen, die aus bis 150 μ langen Nadeln zusammengesetzt sind). Auch Blaufärbung mit Piperidin und Nitroprussidnatrium (Lewin) zeigt Akrolein an. In Sublimaten, in denen andere, uns unbekannte Körper zugegen sind, ist diese Reaktion aber ebensowenig beweisend, wie die in der Kälte eintretende Reduktion mit ammoniakalischer Silbernitratlösung. Zum Nachweis von Glyzerin im Gewebe geben reifende Samen das beste Material. Wässerige Lösungen von Glyzerin versetzt Behrens[3]) im Proberöhrchen mit etwas langfaserigem Asbest und Kaliumhydrosulfat, erhitzt und stellt den Akroleingeruch fest.

In konz. Schwefelsäure sind Fette und ätherische Öle unlöslich. Bei Abwesenheit letzterer kann man durch Schwefelsäure die Präparate zerstören, wobei die Fetttröpfchen hervortreten und zu größeren Tropfen ineinanderfließen. Bei Zusatz von Schwefelsäure und Osmiumsäure nehmen die sich ansammelnden Tropfen braunschwarze Färbung an. Die Reaktion läßt sich zum Nachweis sehr kleiner Fettmengen ver-

---

[1]) A. Niethammer, Weitere Untersuchungen über den qualitativen Nachweis von Fetten unter Hervorhebung von Mikromethoden, Biochem. Zeitschr. 1930, CCXVII, S. 436.

[2]) H. Behrens, p-Nitrophenylhydrazin als mikrochemisches Reagens, Chem.-Ztg., 1903, XXVII, S. 1105.

[3]) H. Behrens, Beiträge zur mikrochem. Analyse organischer Verbindungen I, Chem.-Ztg., 1912, XXVI, S. 1125.

wenden. Doch muß die Fettnatur durch andere Reagentien sichergestellt sein. So kann man Pollen und Sporen mit Schwefelsäure-Osmiumsäure behandeln und durch einen Druck auf das Deckglas die Körner zum Platzen und das Fett zur Anschauung bringen.

Salzsäure in Dampfform wurde von Mesnard[1]) zur Differentialdiagnose von ätherischem Öle und Fett herangezogen (Ausführung der Reaktion s. äth. Öle). Die Schnitte werden in stark zuckerhaltigem Glyzerin den Dämpfen einer konz. Salzsäure ausgesetzt, ätherische Öle verschwinden bald. Dauert nun die Einwirkung der Salzsäure-Dämpfe 1—1½ Tage, dann ist der gesamte Zellinhalt bis auf das Fett zerstört. Das Fett hat sich in einigen Tropfen angesammelt. Kurze Einwirkung (2 Sekunden) von Joddämpfen färbt die Tropfen goldgelb, so daß sie sich sehr scharf abheben. Wird nun der Durchmesser der Tropfen gemessen, dann läßt sich leicht die im Schnitte enthaltene Fettmenge berechnen. Salpetersäure, salpetrige Säure und ihre Dämpfe können gleichfalls benutzt werden. Bei diesen Reaktionen mit Säuren, sowie bei einer Anzahl weiterer Reaktionen treten Färbungen ein, die aber sämtlich nur mit Schnitten der Samen und anderer fettreicher Gewebe ausführbar sind. So wird, um nur einige Beispiele anzuführen, mit rauchender Salpetersäure das Öl der bitteren Mandel indigoblau, von Pfirsichen orangegelb, von Aprikosen gelb[2]). Bei diesen Fetten sind die Farben auch mikroskopisch in den Schnitten gut zu erkennen.

Lehrreich sind die Versuche Fischlers[3]) im tierischen Gewebe den Fetten mikrochemisch nachzugehen und den Auf- und Abbau von Fett zu verfolgen. Die Spaltungsprodukte (freie Fettsäuren, fettsaure Salze, Seifen) müssen dann an Ort und Stelle nachgewiesen werden. Die Gewebe werden mit reiner konzentrierter Kupferazetatlösung behandelt. Die freien Fettsäuren bilden palmitin-, stearin- oder oleinsaure Kupfersalze, die mit Weigertschem Haematoxylin Lacke bilden, welche in Weigertscher Differenzierungsflüssigkeit[4]) fast unlöslich sind. Um die Seifen (Kalium- und Natriumsalz der Fettsäuren) nachzuweisen, sind diese erst in unlösliche fettsaure Salze überzuführen, da sonst die Seifen leicht in die Fixierungsflüssigkeit übergehen. Die Überführung wird durch salizylsaures Kalzium bewirkt. Die auf Seifen zu untersuchenden Gewebestücke werden mit 10proz. Formollösung fixiert, der bis zur Sättigung salizylsaures Kalzium zugesetzt ist. Darauf folgt wiederum Verkupferung mit Kupferazetat und Kupferlackbildung mit Haematoxylin. Vergleichspräparate zeigen nun, ob neben freien Fettsäuren noch Seifen im Gewebe zugegen sind.

---

[1]) E. Mesnard, Recherches sur la localisation des huiles grasses dans la germination des graines, Compt. rend., 1893, CXVI, S. 111.

[2]) H. V. Rosendahl, Svensk. Farm. Tidskr., Jan. 1907, XI.

[3]) F. Fischler, Über die Unterscheidung von Neutralfetten, Fettsäuren und Seifen in Geweben, Zentralbl. f. Pathol. u. pathol. Anatom., 1904, XV, S. 913.

[4]) Ferrizyankalium 2,5, Borax 2,0, Wasser 100.

Zum Nachweis der Fette in Bakterien (B. tumescens) benutzt A. Meyer[1]) Sudan III (rot) und Dimethylamidoazobenzol (gelb). Letzterer Farbstoff wurde schon von Michaelis gebraucht, Kohl färbte die Fette der Cyanophyceen damit. Gute Erfolge geben Doppelfärbungen mit Methylenblau einerseits und den beiden Farbstoffen andererseits. Von Eau de Javelle werden die Fetttropfen schwer angegriffen, lösen sich hingegen leicht in starker Chloralhydratlösung (5 g auf 2 g Wasser). Nach Unna leistet bei Bakterienfetten Osmiumsäure gute Dienste und Czaplewski[2]) führt Scharlach R., Alkannin und Cyanin ebenfalls als brauchbar an.

In den höheren Pilzen sammelt sich das Fett oft in großen Tropfen an, so in den Sklerotien (von Claviceps purpurea) und in Conidien. Myelinbildung gelingt in den Hyphen mit 10—15proz. Ammoniak, Verseifung selbst außerhalb des Gewebes schlecht und nicht immer, besser im Sublimat, in dem sich auch Fettsäurekristalle finden.

Über das Fett der Fettzellen der braunen Parmelien, das Zukal als Reservestoff, Fünfstück als Exkret betrachtet, hat Rosendahl[3]) eingehende Angaben gemacht. Nach Bachmann[4]) kommen Ölzellen nicht nur bei Kalkflechten, sondern auch bei allen granitbewohnenden Flechten vor. Ihr Inhalt wird mit Alkanna rot. Besser eignet sich Osmiumsäure, da die Färbung selbst bei kleinsten Tropfen bestehen bleiben soll. Alkannatinktur durchdringt zudem die Zellwände nur sehr langsam. Bei Sphyridium byssoides tritt zunächst ein eiweißartiger Stoff auf und erst im Alter ist „ein dem Eiweiß eingebettetes Fettkügelchen zu erkennen“ (a. a. O. S. 12). Bachmann berechnet auch die Anzahl der Ölzellen bei einigen Granitflechten.

In Acetabularien (Sporen, Schirmen) kommen rote Pigmenttröpfchen vor (Woronin, de Bary, Leitgeb[5])), die sich beim Einlegen der Algen in Weingeist teils in Körnchen, teils kristallinisch (Blättchen, Stäbchen, oft zu Aggregaten vereinigt) abscheiden. Sie lösen sich in

[1]) A. Meyer, Notiz über das Verhalten der Sporen und Fetttropfen der Bakterien gegen Eau de Javelle und gegen Chloralhydratlösung, Centralbl. f. Bakt., 1901, Abt. 1, XXIX, S. 809.

[2]) Czaplewski, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1901, XVIII, S. 495.

[3]) H. V. Rosendahl, Vergleichend-anatomische Untersuch. über die braunen Parmelien, Nov. act. Leop.-Car., 1907, LXXXVII, S. 401.

[4]) E. Bachmann, Die Rhizoidenzone granitbewohnender Flechten, Jahrb. f. wiss. Bot., 1907, XLIV, S. 1. Vgl. auch Stahlecker, Untersuchungen über Thallusbildung und Thallusbau in ihren Beziehungen zum Substrat bei siliciseden Flechten, Dissertation, Stuttgart 1905.

[5]) H. Leitgeb, Die Inkrustation der Membran von Acetabularia, Sitzgsber. Wiener Akad., 1887, XCVI 1, S. 15.

Weingeist und in Äther, werden von Schwefelsäure vorübergehend blau gefärbt und durch Kalilauge beim Erwärmen in rote Tröpfchen übergeführt. Sie werden für eine fettartige Substanz gehalten, die den Farbstoff führt. In Peridineen hat Schütt[1]) Fettplatten (Osmiumsäure) angetroffen, die ebenfalls weiter zu studieren wären.

Bei den höheren Pflanzen gibt es noch viele „Fett- und Ölkörper", deren Studium noch nicht abgeschlossen ist. Hierher zählen die von Radlkofer[2]), Monteverde[3]), Solereder[4]), Zimmermann[5]) beschriebenen kugligen Gebilde, die in den Blättern (Mesophyll) vieler höherer Pflanzen beobachtet wurden (Cinchoneen, Combretaceen, Cordiaceen, Gaertneraceen, Gramineen, Rubiaceen, Sapindaceen, Sapotaceen u. a.). Die Gebilde liegen oft in der Einzahl in der Zelle, erreichen bisweilen Chloroplastengröße (2—15 μ), sind meist isotrop, vereinzelt doppelbrechend. Die Doppelbrechung verschwindet bei Gramineen, wenn man die Präparate in Wasser auf 50—55^0 C erwärmt. Sie geben Fettreaktionen, mit dem Verseifungsverfahren aber keine Seifenkristalle (Zimmermann). Auch in ihren Lösungsverhältnissen zeigen die Tropfen, selbst bei nahestehenden Pflanzen, ein verschiedenes Verhalten. Die Öltropfen der Nadeln von Abies sibirica lösen sich leicht in wässeriger Chloralhydratlösung, die in Taxus baccata sind nach Rywosch[6]) darin unlöslich. Für die Verschiedenheit der Bildungen spricht ferner der Befund, daß die Tropfen von Abies durch Kochen mit Wasser vertrieben werden können, trotzdem sie bei der Verseifung Seifenkristalle geben, die von Taxus aber nicht. Ferner fand Monteverde in Gramineen ölartige Tropfen, die hauptsächlich aus Harz bestehen sollen (?), trotzdem sie sich nach seiner Angabe mit Alkanna nicht färben. In all diesen Bildungen liegen jedenfalls Gemische verschiedener Körper mit wechselnden Mengen fettartiger Anteile vor.

In den Chromatophoren ziemlich verbreitet sind kleine stark lichtbrechende Tröpfchen, die gewöhnlich als Öltropfen bezeichnet werden. Ihr reaktionelles Verhalten weist teils auf Fette, teils auf ätherisches Öl hin, ja es ist nicht ausgeschlossen, daß wir in diesen

[1]) F. Schütt, Sitzgsber. Berl. Ak., 1892, S. 377.

[2]) L. Radlkofer, Z. Klärung v. Theophrasta u. d. Theophrasteen, Sitzgsb. Münchener Akad., math.-phys. Klasse, 1889, XIX, S. 221.

[3]) N. A. Monteverde, Üb. d. Ablagerung von Kalzium- u. Magnesiumoxalat in d. Pflanze, Bot. Zentralbl., 1885, XLIII, S. 327.

[4]) H. Solereder, Studien über d. Tribus d. Gaertnereen, Ber. d. bot. Ges., 1890, VIII, S. 71.

[5]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik 1892, S. 206.

[6]) S. Rywosch, In grünen Zellen vorkommendes Öl und seine Beziehung zur Herbstfärbung, Ber. d. bot. Ges., 1897, XV, S. 199.

Tröpfchen weder Fette noch ätherische Öle vor uns haben, sondern Substanzen unbekannter Natur (Aldehyde ?). Vielfach liegen in den Tropfen keine reine Substanzen, kein reines Fett u. dgl., vor, sondern Gemische verschiedener Körper. Darauf deutet bereits ihr Verhalten gegen Chloralhydratlösung hin, in der sie teils leicht, teils schwer löslich sind. In Wasser und Essigsäure sind sie unlöslich, hingegen leicht löslich in Äther und Weingeist (selbst in verdünntem). Sie speichern Fettfarbstoffe und bräunen sich langsam mit Osmiumsäure. Die Tropfen in den Chromatophoren alter Blätter führen auch Zersetzungsprodukte des Chlorophyllfarbstoffes.

Die von den älteren Autoren als Bläschen angesprochenen, bis 50 μ großen Gebilde im Milchsaft der Blätter von Musa chinensis, die Trécul[1]) für Kautschuk hält, sind nach Molisch[2]) Fett. Sie sind teils dünnflüssig, teils von zäher Konsistenz. Letztere sollen einen deutlichen Kern, konzentrische Schichtung und eine Membran zeigen, und kristallinischer Natur sein. Sie schrumpfen in Weingeist ohne zu verschwinden, lösen sich leicht in Chloroform, Äther, Schwefelkohlenstoff, Benzol, färben sich mit Osmiumsäure (schwarz) und mit Alkannatinktur (rot). Über die Verseifungsergebnisse berichtet Molisch nicht. Auch A. Meyer (Chlorophyllkorn) kommt auf die Natur der „Öltropfen“ der Musaceen zu sprechen; da sie sich leicht im Weingeist und Chloralhydrat lösen, so scheinen sie keine Fette zu sein.

Das im Innern der Gewebe auftretende sog. Wachs (s. auch Membranwachs) gehört fast stets zu den Fetten, so das Wachs der Rhus-Früchte (Japanwachs), das richtiger als **Japantalg** zu bezeichnen ist. Es besteht hauptsächlich aus Fettsäuren (E. Tassilly, Bull. Soc. Chim., 1911, IX, S. 608); in dem Unverseifbaren (nur 0,68 %) finden sich Myricylalkohol, Phytosterin, Cerylalkohol u. a. (H. Matthes und W. Heintz, Arch. d. Pharm., 1909, CCXLVII, S. 650.) Der Japantalg der Rhusfrüchte wird von Tauben gefressen, ist also Anlockungsmittel und dient der Verbreitung der Samen (Moebius)[3]). Die ersten „Wachskörnchen entstehen innerhalb des Plasmaschlauches chlorophyllfreier Zellen“, zu ihrer Bildung wird Stärke verbraucht (A. Meyer)[4]). Im Embryo hat das Fett noch normale Konsistenz und dient als Reservestoff. Erst im Mesokarp der reifenden Frucht nimmt es wachsartige

---

[1]) A. Trécul, Des vaisseaux propres et du tannin dans les Musacées, Ann. d. sc. nat., 1867, 5. Sér. VIII, S. 283.

[2]) H. Molisch, Über Zellkerne besonderer Art, Bot.-Ztg., 1899, LVII, S. 177.

[3]) M. Moebius, Wachsausscheidungen im Innern von Zellen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1897, XI, S. 445.

[4]) A. Meyer, Über die Entwicklung des Wachses der Frucht von Rhus toxicodendron, Arch. d. Pharm., 1879, CCXVII, S. 514.

Konsistenz an und lagert sich als weiße Krusten den Zellwänden an (Tabata)[1]. Es löst sich in Terpentinöl (Moebius), aber nicht in kaltem Alkohol und kaltem Äther, wird von Mineralsäuren nicht angegriffen und läßt sich mit Kalilauge verseifen (A. Meyer). Das Rhuswachs leuchtet (im Gegensatz zu den Membranwachsen) im polarisierten Lichte nicht auf.

Anacardsäure[2]

Eine Fettsäure scheint die Anacardsäure, die neben Cardol in den großen Cardol-Kammern des Mesocarps der Früchte von Anacardium occidentale L. vorkommt. Sie gibt mit Ammoniak Myelinformen.

Phosphatide

Der Begriff der Phosphatide ist am Lezithin entstanden, einem in Äther und Weingeist löslichen Stoff, der durch Hydrolyse in Phosphorsäure, Glyzerin, Fettsäuren und Cholin aufgespalten werden kann und umfaßt ursprünglich Stoffe vom Typus des Lezithins, die aber statt Glyzerin und Cholin auch andere Alkohole und Basen enthalten können. Durch Hansteen-Cranner ist dann der Begriff auf kompliziertere Stoffe ausgedehnt worden, auch auf solche, die zum Unterschied von den ursprünglichen Phosphatiden wasserlöslich sind, d. h. wohl Kolloidlöslichkeit zeigen.

In physiologischer Hinsicht sind die Phosphatide zweifellos wichtige Stoffe, die in keiner Zelle fehlen und Bestandteile des Plasmas sind; nach Hansteen-Cranner[3]) sind sie ein wesentlicher Teil der plasmatischen Grenzschichten und der Zellwand.

Hansteen-Cranner[4]) gibt an, daß Wurzeln u. a. Zellgewebe der verschiedensten Pflanzen an reines Wasser reichlich wasserlösliche und wasserunlösliche Phosphatide abgeben und sprach den Gedanken aus, daß diese sowohl im Plasma als in der Zellwand als die Bildner der Grenzschichten für die Permabilitätsverhältnisse der Zelle maßgebend sind. Die Versuche wurden dann durch Grafe weitergeführt.

[1]) S. Tabata, Über die Früchte und Keimpflanzen von Rhus succedanea L, Journ. of Coll. Univ. Tokio, 1907, XXIII, S. 1.

[2]) E. Kratzmann, Zur Anatomie und Mikrochemie der Acajounuß (Anacardium occidentale L.), Pharmaz. Post, 1914, XLVII, S. 375.

[3]) B. Hansteen-Cranner, Beiträge zur Biochemie und Physiologie der Zellwand und der plasmatischen Grenzschichten, Ber. deutsch. bot. Ges., 1919, XXXVII, S. 380.

[4]) B. Hansteen-Cranner, Zur Biochemie und Physiologie der Grenzschichten lebender Pflanzenzellen, Meldinger fra Norges Landbrukshøiskole, 1922, II, H. 1/2.

Nach Hansteen-Cranner ist der Zellkern der Sitz für den synthetischen Aufbau der Zellphosphatide. „Der Zellsaft aber besteht aus löslichen Phosphatiden, die immer bis zu einer bestimmten Gleichgewichtslage von der chromatischen Substanz, d. h. von den unlöslichen Kernphosphatiden abgegeben werden. Diese löslichen Kernphosphatide können dann ins Zytoplasma herausdiffundieren und hier das Material für die Plasmamembran und für die Zellwände abgeben, da sie stets Wandmaterial in Form von Pektinen und anderen Kohlehydraten mit sich führen" (Grafe)[1].

Unlösliche Phosphatide verhalten sich Kernfarbstoffen und Doppelfärbungen gegenüber genau so, „wie die chromatische Substanz des Zellkerns, auch sonst zeigen dieselben gleiche Reaktionen, wie die Nukleine des Zellkerns, so daß die Vermutung naheliegt, die Nukleinreaktionen des Zellkerns rührten vom Stickstoffkomplex der Phosphatide und nicht von Eiweißkörpern her" (Grafe).

Über den Nachweis des Phosphors in den Phosphatiden s. S. 147.

Über Phosphatide vgl. ferner:

H. Magistris und P. Schäfer, Zur Biochemie und Physiologie organischer Phosphorverbindungen in Pflanze und Tier I. Über die Phosphatide und Lecithide aus der Ackerbohne (Vicia Faba), Biochem. Ztschr., 1929, CCXIV, S. 401, II. Studien über den Austritt von wasserunlöslichen Phosphatiden und Zellfarbstoff bei der roten Rübe (Beta vulgaris Rapa f. rubra), ebenda, S. 440.

Phytosterine

Die Phytosterine (hydrozyklische ein- oder zweiwertige Alkohole) stehen den Cholesterinen des Tierkörpers sehr nahe und kommen in geringer Menge in allen plasmahaltigen Zellen vor; in größerer Menge finden sie sich in den fetthaltigen Zellen sowohl in höheren als niederen Pflanzen (Rinden, Blüten, Samen, Sklerotien), auch in unterirdischen Organen (Enzianwurzel, Zwiebeln von Scilla). In Sekreten scheinen sie häufig zugegen zu sein. Eine große Anzahl hierher gehörender Stoffe ist bisher isoliert worden (aus Physostigma, Pisum, Coffea, Colchicum, Soja, Ergosterin aus Mutterkorn, Paracholesterin aus Aethalium septicum, Lupeol aus Lupinus luteus; vorzüglich aus Leguminosen sind phytosterinartige Alkohole bekannt, ferner das Quebrachol aus Quebracho und viele andere.

Im isolierten Zustande bilden die Phytosterine perlmutterglänzende Blättchen von verschiedener Form (Rechtecke, oft mit abgestutzten Ecken oder schiefgestellten Enden und sechseckige Täfelchen), die gerade auslöschen (Cholesterinkristalle bilden viereckige rhombische Täfelchen). Sie können von den Fetten durch Verseifung getrennt werden, bleiben in dem Unverseifbaren der Fette zurück, aus dem sie durch Ätheralkohol gewonnen werden. Ihre Lösungsverhältnisse stimmen

[1]) V. Grafe, Zur Physiologie und Chemie der Pflanzenphosphatide, Biochem. Zeitschr., 1925, CLIX, S. 444. — V. Grafe u. O. Horvat, Die wasserlöslichen Phosphatide aus der Wurzel der Zuckerrübe, ebenda, S. 449 und folgende Arbeiten.

im wesentlichen mit denen der Fette überein; sie lösen sich in Äther, Chloroform, Weingeist, Ätherweingeist, heißer wässeriger und in kalter weingeistiger Chloralhydratlösung. Aus heißem Anilin scheiden sie sich sofort wieder aus, zum Teil in nadelförmigen Gebilden, die strauchartig oder zu Sternen angeordnet sind (Fig. 61 a).

Die Phytosterine geben (ebenso wie die Cholesterine) einige Farbenreaktionen, die in der Chemie zur Erkennung herangezogen werden. Es sind folgende: Schwefelsäure färbt meist intensiv blutrot[1]). Farbenreaktionen des Ergosterins s. R. Meesemaecker, Cpt. rend. Acad. sciences, 1930, CXC, S. 216. Trichloressigsäure (9+1 Teil Wasser) färbt hell- bis rotviolett, vornehmlich nach Erhitzen oder bei Zusatz von Salzsäure. Die Chloroformlösung wird bei Zusatz von Schwefelsäure blutrot. Die Lösung in Essigsäureanhydrid wird durch Schwefelsäure vorübergehend rosenrot, dann blau oder grün. Viele Phytosterine werden durch Schwefelsäure rot gefärbt, fügt man etwas Jod zu, dann entsteht eine violette, blaue, schließlich eine rötliche Färbung. Bringt man auf einige Splitter von reinem Phytosterin einen Tropfen Schwefelsäure, läßt darauf etwas Chloroform fallen und bedeckt mit dem Deckglase, dann sind die Chloroformtropfen in kurzer Zeit rosenrot, nach längerer Zeit braunrot gefärbt. Fügt man zu dem die Phytosterinkristalle führenden Schwefelsäuretropfen seitlich eine Spur Jodjodkalium zu, so erfolgt (neben Jodausscheidungen) eine intensive jodstärkeblaue Färbung der Kristalle, die schließlich in Gelbrot bis Rotbraun übergeht.

Fig. 61. *a*) Phytosterinkristalle, aus den großen Kristallen des Handelspräparates mit Alkohol am Objektträger umkristallisiert. *b*) Nicotiana tabacum (Epidermis, altes [illegible], [illegible]rote Kristalle, d[illegible] geben (Tunmann)

Alle Farbenreaktionen sind zum strengen Nachweis von Sterinen unbrauchbar und können nur zur Bestätigung anderer Befunde herangezogen werden, da sie auch mit anderen Stoffen eintreten.

Bei der Sublimation liefert Cholesterin (Handelspräparat) sofort gut ausgebildete Kristalle (Täfelchen), während Phytosterin ein aus rundlichen und langgestreckten glänzenden Tropfen (flüssige Kristalle) bestehendes Sublimat bildet; in den Tropfen sind erst nach längerer Zeit in polarisiertem Lichte vereinzelte Kristalle zu erkennen. Der Nachweis der Phytosterine gelingt häufig in Schnitten der Samen, wenn man einige Präparate sublimiert und die öligen Präparate nach eintägigem Liegen mit Schwefelsäure-Chloroform prüft. Weit schwieriger

gestaltet sich der Nachweis in vegetativen Geweben. In Herbarmaterial und in Pflanzen, die einige Zeit in 60—70proz. Weingeist verweilt haben, kommt es zuweilen zur Abscheidung von Kristalltäfelchen und -nadeln, welche die Chloroform-Schwefelsäurereaktion geben. Derartige Kristalle speichern Farbstoffe und erscheinen oft in gelben bis braunroten Farben (Fig. 61 b).

Werden fetthaltige Präparate längere Zeit in Glyzerin aufbewahrt, dann scheiden sich in den Öltropfen bisweilen Kristalle aus. Sie werden teils als Fettsäure- teils als Phytosterinkristalle angesprochen (Bertrand). Auch beim Einlegen von Präparaten der Blütenblätter (Calendula off., Gazanea splendens, Silphium perfoliatum) in weingeistige Kalilauge bilden sich in den Öltropfen Kristalle, die Kohl[1]) für Phytosterinsphärite hält. Ebenso geben die vielerwähnten Tröpfchen in den Leukoplasten der Epidermis von Agave americana und des Stengelparenchyms von Equisetum arvense Phytosterinsphärite. Kohl faßt diese Einschlüsse als Fettbildner auf. Ihre fettartige Natur wurde übrigens schon lange vorher von A. Meyer[2]) festgestellt. Haben die Phytosterinkristalle Farbstoffe gespeichert, so kann man nach Molisch[3]) die Präparate einige Tage in Bromwasser legen und dann erst mit Schwefelsäure oder mit Schwefelsäure-Chloroform prüfen.

Sicherer und soweit bisher bekannt eindeutig lassen sich Sterine als Digitoninsteride nachweisen, seit Windaus 1909 bekannt gab, daß Cholesterin durch weingeistige Digitoninlösung als kristallinisches Digitonincholesterid gefällt wird. Die Doppelverbindung ist unlöslich in Wasser, Azeton, Äther, kaum löslich in kaltem Weingeist, gut löslich in Eisessig, Pyridin und konzentrierter Chlorallösung. Von den Fettfarbstoffen werden die Kristalle nicht gefärbt. Brunswik[4]) legt die Schnitte in eine ½proz. Lösung von Digitonin in 85proz. Weingeist. Man erhält dann alsbald Nadeln oder flächige Nadelbüschel des Digitoninphytosterids. Die Schnitte müssen möglichst wasserfrei sein, da die Verbindung durch Wasser gespalten wird. Feuchte Schnitte müssen zuerst in der Kalziumchloridkammer entwässert werden. Klein und Pirschle[5]) verfahren so, daß sie zum Präparat (eingetrockneter Milchsafttropfen, Gewebeschnitt) unter Deckglas 96proz. Weingeist zufügen, am Wasserbad auf etwa die Hälfte eindampfen und dann rasch Digitoninlösung (etwa 1proz. in 96proz. Weingeist) zufließen lassen. Sofort

[1]) F. G. Kohl, Untersuchungen über das Carotin und seine physiol. Bedeutung in der Pflanze, Leipzig 1902.

[2]) A. Meyer, Das Chlorophyllkorn, Leipzig 1883.

[3]) H. Molisch, Ber. deutsch. bot. Ges., 1896, XIV, S. 28.

[4]) H. Brunswik, Der mikrochemische Nachweis der Phytosterine und von Cholesterin als Digitonin-Steride, Zeitschr. wiss. Mikroskopie, 1922, XXXIX, S. 316.

[5]) G. Klein u. K. Pirschle, Nachweis und Verbreitung der Phytosterine im Milchsaft, Bioch. Zeitschr., 1923, CXXXXIII, S. 457.

oder nach 1—2 Minuten zeigen sich am Deckglasrande und in der Nähe des Objekts die charakteristischen scheibchenförmig flachen Nadelbüschel des Reaktionsproduktes. Auskristallisiertes Digitonin läßt sich durch mehrmaliges Durchsaugen von heißem Weingeist in Lösung bringen.

Bei eingetrockneten Milchsäften und Harzen läßt man am besten vorher Chloroform unter Deckglas zufügen und nimmt die Reaktion nach dessen Verdunstung vor.

Pflanzen, die unter günstigen Bedingungen gezogen werden, enthalten mehr Sterine im Milchsaft als unter ungünstigen Bedingungen gezogene (Klein und Pirschle).

Bei der sehr großen Empfindlichkeit der Reaktion, die noch mit dem Trockenrückstand eines Tropfens einer 0,00016proz. Lösung von Cholesterin eintritt, ist es nötig, völlig reine fett- und schweißfreie Objektträger und Deckgläschen zu verwenden, da schon ein — stets cholesterinhaltiger — Fingerabdruck die Reaktion eintreten läßt (Brunswik).

Zu den phytosterinartigen Alkoholen gehört das Alkornin, das bis zu 1,25 % in der Rinde von Bowdichia virgilioides, der Alcornocorinde des Handels, vorkommt. Es läßt sich mit Jodjodkaliumlösung nachweisen, der einige Tropfen konzentrierter Schwefelsäure zugefügt sind. Man entfernt zunächst die Stärke durch mehrtägige Mazeration mit verdünnter Natronlauge und wiederholtes Auswaschen mit Wasser; nachfolgender Zusatz von Jodjodkalium-Schwefelsäure zeigt die dunkelblauen Zellulosemembranen und in den Zellen durch eine homogene Violettfärbung den Sitz des Alkornins. Alkornin findet sich im inneren Parenchym der Mittelrinde, im Bast und besonders in den Markstrahlen (Hartwich und Dünnenberger)[1].

Onocol (Onocerin)[2]

Onocol (Hlasiwetz, Thoms) ist ein zweiwertiger sterinartiger Alkohol, der in der Wurzel von Ononis spinosa L. vorkommt.

Mikroskopisch kleine, farblose Prismen (F. 232°) schwer löslich in Weingeist, Essigäther, Azeton, Äther, Chloroform, Benzol, leichter in Toluol, reichlich in Amylalkohol, Terpentinöl und Eisessig.

Löst sich in konzentrierter Schwefelsäure beim Erwärmen mit roter und rotbrauner, in schmutzigbraun übergehender Farbe. Unterschichtet man die Lösung in Eisessig mit konzentrierter Schwefelsäure, so ent-

[1]) C. Hartwich und E. Dünnenberger, Über eine als Jaborandi in den Handel gekommene Alcornocorinde usw., Arch. d. Pharm., 1900, CCXXXVIII, S. 341, Dissert., Zürich 1900, S. 53.

[2]) O. Tunmann, Über Radix ononidis, Ber. deutsch. pharmaz. Ges., 1914, XXIV, S. 55.

steht eine bläulichgrüne, bald in gelbbraun übergehende Zone, der Eisessig färbt sich rosa. Schüttelt man um und erwärmt, so wird die Mischung kirschrot, zeigt stark grüne Fluoreszenz und gibt mit Chloroform geschüttelt an dieses einen roten Farbstoff ab. Fügt man zu der kaltbereiteten Lösung des Onocols in konzentrierter Schwefelsäure einen Tropfen Jodwasser, so tritt Karminfärbung auf.

Erwärmt man einen kleinen Schnitt (mit Rinde!) oder etwas Pulver unter Deckglas zweimal mit 80proz. Weingeist, Eisessig oder noch besser mit Amylalkohol, so erhält man beim Erkalten Onocol teils als moosartige Bildungen, teils als feine Nadeln, teils als kleine Individuen, die graue Interferenzfarben haben und parallel zur Längsachse auslöschen. Dieselben Kristalle findet man in den Mikrosublimaten, außerdem feine Prismen, die um einen Mittelpunkt sternförmig anschießen, sehr lange Kristallfäden und körnige Sublimate. Nicht gutkristallinische Sublimate können durch Umkristallisieren aus Weingeist in gute Kristalle (feine Haarformen, sternförmige Gruppen) übergeführt werden.

Die durch Extraktion und Sublimation gewonnene Kristalle geben die oben geschilderten Reaktionen mit Schwefelsäure und Jod-Schwefelsäure. Letztere kann auch zur Lokalisationsermittlung verwendet werden.

Tunmann fand das Onocol außer in der Borke — auch in der abgestoßenen — im Phloem- und Markstrahlparenchym der Rinde, nicht im Holz.

Urson

Urson bildet glänzende Nadeln (F. 279—280°). Unöslich in Wasser, schwer in Weingeist und Äther löslich. Es ist nach van der Haar isomer mit dem Caryophyllin (s. dieses). Sublimierbar.

Urson ist nachgewiesen in Arctostaphylos uva ursi, Erica arborea, E. carnea, E. mediterranea, Ilex aquifolium, Pirola minor, P. rotundifolia, P. umbellata, Vaccinium myrtillus, Vaccinium vitis idaea.

Über die Verbreitung des Ursons s. A. M. Nooyen, Pharm. Weekbl., LVII, S. 1128; Chem. Zentralbl., 1920, III, 932.

Urson steht den Phytosterinen nahe und gibt deren Farbenreaktionen (s. S. 267).

Zum mikrochemischen Nachweis des Ursons eignet sich folgende Reaktion: Kristalle (Sublimat) werden auf dem Deckglas in 1—2 Tropfen Äther gelöst und ein Deckglas, das an der Unterseite einen ganz kleinen Tropfen 15proz. Kalilauge trägt, auf den Äthertropfen aufgelegt, so daß der Kalilaugetropfen ganz vom Äther umspült ist. An der Berührungsstelle der beiden Flüssigkeiten bildet sich ein band-

artiger grauer Niederschlag aus feinsten Nädelchen von Urson-Kalium (Fischer u. Linser[1])).

Für den Nachweis in Pflanzen extrahiert Fischer mit Linser 1—1,5 g fein gepulvertes Material nach vorherigem Ausziehen mit salzsäurehaltigem Wasser und Äther und sublimiert den Ätherrückstand[2]) in seinem Apparat[3]) (s. S. 37) zwischen 230 und 250°. Von den Sublimaten (prismatische Nadeln mit zarten Umrissen) wird eines mit Wasser vorsichtig gewaschen, dann im Exsikkator getrocknet und zur Bestimmung des Schmelzpunktes benützt; ein anderes dient zur Ausführung obiger Reaktion. Man kann Urson neben Arbutin (s. dieses) in einem Arbeitsgang nachweisen, indem man zunächst nach Wegsublimieren des Hydrochinons die Temperatur des Ölbades eine Viertelstunde auf 200° beläßt und dann bei höherer Temperatur (s. oben) weiter sublimiert.

Euphorbol

Aus dem Euphorbon (Dragendorff und Alberti, Flückiger), dem Harzbestandteil des Milchsaftes der Euphorbiaceen, besonders auch der Euphorbia resinifera isolierten Bauer und Schenkel[4]) den nicht zu den Sterinen gehörigen Alkohol Euphorbol. Geruch- und geschmacklose prismatische Nadeln (F. 122°). Leichtlöslich in Petroläther, Benzol, Weingeist, Chloroform, Azeton, schwerer in Methanol. Da er der einzige bisher bekannte kristallinische Stoff aus Euphorbium ist, so ist er wohl identisch mit den Nadelbüscheln und Einzelkristallen, die man aus Milchsäften, die reich an Euphorbon sind, mit Azeton oder Äther erhalten kann.

Flüchtige Amine

Eine systematische Durchsuchung von Pflanzen auf flüchtige Amine ist von Klein und Steiner vorgenommen worden. Vorher waren nur verhältnismäßig wenige Vorkommen bekannt, so das von Methylamin in Mercurialis-Arten und Kalmus, von Isobutylamin (in Form von Säureamiden) in Fagara Xanthoxyloides und Rad. Pyrethri und von Isoamylamin im Tabak. Klein und Steiner[5]) fanden

---

[1]) R. Fischer u. E. Linser, Der mikrochemische Nachweis geringer Mengen von Arbutin und Urson in Pflanzen. Arch. d. Pharmazie, 1930, CCLXVIII, S. 185.

[2]) Man läßt den Äther mit Hilfe eines Kapillartrichters oder eines Augentropfers auf den Boden des im Ölbade erhitzten Sublimationsröhrchens abtropfen (etwa 20 Tropfen in der Minute).

[3]) R. Fischer, Pharmaz. Monatshefte, 1927, VIII, S. 195.

[4]) K. H. Bauer u. P. Schenkel, Zur Kenntnis des Euphorbiumharzes, Arch. der Pharmazie, 1928, CCLXVI, S. 633.

[5]) Klein u. Steiner, l. c., S. 179; ferner M. Steiner, Weitere Untersuchungen über flüchtige Stickstoffbasen bei höheren Pflanzen, Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1929, XVII, S. 247.

Amine in 42 von den untersuchten 103 Arten, hauptsächlich in Blüten, weniger in Blättern. Sie fanden Methylamin, Dimethylamin, Trimethylamin, i-Butylamin und i-Amylamin. Von biologischem Interesse sind diese Amine, soweit sie der Fortpflanzung dienen (so auch bei Phallus impudicus).

Die Pflanzen wurden zuerst in einem besonderen Apparat durchlüftet, wobei die abgesaugten Basen in einem Kaliapparat mit verdünnter Salzsäure aufgefangen wurden. Dann wurde das Pflanzenmaterial mit 2proz. Sodalösung + 5% NaCl destilliert. Das Destillat wurde in einer 10proz. Salzsäure enthaltenden Péligot-Röhre aufgefangen, dann auf dem Wasserbad im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt. Falls Aufbewahrung nötig, so erfolgte sie in luftdicht verschlossenen Reagensgläsern nach Zusatz eines Körnchens Thymol.

Die Identifizierung erfolgte nach folgendem Verfahren: Auf den Boden einer Mikrogaskammer (Glasring von 1 cm innerem Durchmesser und 6 mm Höhe mit venetianischem Terpentin auf einen Objektträger aufgekittet) gibt man 1—2 Tropfen 30proz. Natronlauge und einen Tropfen der neutralen oder schwach sauren Flüssigkeit. Man bedeckt sofort mit einem Deckgläschen, auf dessen Unterseite sich einige mit einem Tröpfchen destilliertem Wasser aufgeschwemmte Kristalle von Dinitro-α-Naphthol befinden. Bei größeren Mengen von Aminen wechselt man das Deckgläschen wiederholt und erzielt damit eine Fraktionierung. Zur weiteren Untersuchung bringt man das Deckgläschen mit den Kristallen nach unten auf einen Objektträger.

Steiner und Löffler[1]) änderten das Verfahren in folgender Weise ab: Teile des frisch gesammelten Materials (einzelne oder mehrere Blüten, Blattstanzen usw.) werden auf den Boden der Mikrogaskammer gebracht, mit einigen Tropfen einer wässerigen Lösung von 5% Soda und 5% Natriumchlorid überschichtet. An das Deckglas kommt wieder eine Aufschwemmung von 2,4-Dinitro-α-Naphthol, in manchen Fällen zur Bestätigung der Diagnose auch die entsprechende β-Verbindung und andere Reagentien. Nach ca. 24 Stunden prüft man die erhaltenen Produkte kristalloptisch und kristallographisch und stellt die Diagnose durch die Umlagerung[2]) und den Schmelz- oder Zersetzungspunkt mit Hilfe des Kleinschen Mikroschmelzpunktapparates fest. Damit konnte bei 48 zum großen Teil neuen Arten das Auftreten von Aminen (Trimethylamin, i-Amylamin, i-Butylamin) festgestellt werden. Unter den

---

[1]) M. Steiner u. H. Löffler, Stickstoffbasen im Eiweißabbau höherer Pflanzen, II. *Histochemische Studien über Verbreitung, Verteilung und Wandel* des Ammoniaks und der flüchtigen Amine, Jahrbücher f. wissensch. Bot., 1929, LXXI, S. 463.

[2]) Durch Erwärmen.

Ergebnissen ist von Interesse das Auffinden von Trimethylamin in den Sporogonen des Mooses Splachnum ampullaceum; es lockt damit Dipteren an, mit deren Hilfe die Verbreitung der Sporen erfolgt.

Bestimmungsschlüssel (Klein u. Steiner)
zur Identifizierung von Ammoniak und einigen aliphatischen Alkylaminen auf Grund der Eigenschaften ihrer Dinitro-α-Naphthol-Verbindungen.

	Gekrümmte peitschenartige Kristallnadeln	Methylamin
	± wohlausgebildete Kristalle	1
1.	Kristalle ± hellzitronengelb	2
	„ dunkelgelb bis braun	11
2.	Auslöschung gerade	3
	„ schief	8
3.	Schmelzpunkt unter 100°	5
	„ über 100°	4
4.	Lange Nadeln	Triäthylamin
	kurze ± isodiametrische Kristalle	Tripropylamin
5.	Kristalle enge untereinander zu Bündeln, diese zu sternartigen Büscheln vereinigt. Umlagerung in hellgelbe, rechtwinklige Tafeln	Allylamin
	Kristalle einzeln oder einzeln zu Büscheln vereinigt . . .	6
6.	Kristalle spitz	7
	„ stumpf oder giebelartig endigend	Trimethylamin
7.	Spieße, Umlagerung zu ± isodiametrischen Platten. . . .	Propylamin
	Prismen mit spitzem Ende, Umlagerung zu langgestreckten Platten	i-Propylamin
8.	Umlagerung zu ebenen Platten, Rand glatt	9
	„ „ „ Platten mit aufgesetzten flachen Pymidenflächen, Rand unregelmäßig	n-Butylamin
9.	Umlagerungsprodukt ± isodiametrische, hellgelbe Platten, Endigung nie treppenartig[1])	i-Amylamin
	Umlagerungsprodukt ± langgestreckte, hellgelbe Platten, nach dem Erkalten durch Querrisse septiert, Endigung oft treppenartig.	n-Heptylamin
10.	Kristalle hellbraun	11
	„ orangegelb	15
11.	Kristalle spitze Nadeln	Ammoniak
	„ von anderem Habitus.	12
12.	Auslöschung gerade	Diäthylamin
	„ schief	13
13.	Schmelzpunkt ohne oder fast ohne vorherige Umlagerung .	Dipropylamin
	Schmelzpunkt nach vorheriger Umlagerung	15

[1]) Falls keiner der beiden angegebenen Gegensätze zutrifft vgl. auch i-Butylamin.

14. Umlagerung in ± isodiametrische braune Platten . . . . Dimethylamin
Umlagerung in langgestreckte dunkelgelbe Platten und Balken . . . . Di-i-Butylamin
15. Kristalle nadelförmig, Endwinkel stumpf . . . . Äthylamin
„ entweder Platten, Prismen oder Klumpen mit spitzen Endwinkeln oder ± isodiametrische Platten . . . i-Butylamin

Über die Eigenschaften von Verbindungen flüchtiger Basen insbesondere mit Trinitro-m-Kresol, Pikrolonsäure, Dinitro-α-Naphthol und Dinitro-β-Naphthol siehe die Arbeit von Steiner u. Löffler, l. c. S. 272).

Cholin

Klein und Zeller fanden bei einer sich über mehr als 100 Arten erstreckenden Untersuchung Cholin überall mit Ausnahme der drei untersuchten Flechten (Evernia prunastri, Parmelia sulcata, P. perforata).

Eine Studie über den mikrochemischen Nachweis des Cholins liegt von Schoorl vor (Pharmazeut. Weekbl. 1918, S. 364).

Nach Klein und Zeller ist Jodjodkalium nach Staněk (100 KJ, 153 J, 200 g H_2O) das empfindlichste (Erfassungsgrenze 0,04 γ) und beste Reagens auf Cholin: Hellgelblich-braune schiefe Prismen und Zwillingsbildungen mit einspringenden Winkeln, oft auch fast tafelförmig ausgebildet, immer schwach durchscheinend (nicht zu verwechseln mit den tiefschwarzen, nicht durchscheinenden Jodkristallen). Die Kristalle verschwinden nach einiger Zeit.

Quecksilberchlorid (konzentrierte Lösung in Weingeist oder mit Salzsäure angesäuerte Lösung in 50proz. Weingeist) erzeugt quadratische Kristalle, oft gefiederte Skelette und vierstrahlig-symmetrische kleine Drusen.

Weitere Reaktionen siehe bei Klein und Zeller[1]).

Zum Nachweis bringt man Schnitte in das Sublimatreagens. Zerkleinertes trockenes Pflanzenmaterial feuchtet man mit salzsauerem Weingeist an und sublimiert im Klein-Wernerschen Apparat zwischen 190 und 250°. Ferner wird ein Extraktionsverfahren angegeben: 0,5proz. frisches Pflanzenmaterial wird in kleinen Glastuben mit 5 ccm eines 96proz. Weingeists übergossen, der auf 100 ccm 1—2 ccm 2 n-Salzsäure enthält. Man beläßt mindestens 24 Stunden, dekantiert den Weingeist in ein kleines Schälchen ab und läßt (wenn nötig unter Erwärmen auf dem Wasserbad) abdunsten. Man nimmt mit 1 ccm Wasser rasch auf und stellt mit je einem Tropfen der Flüssigkeit die Reaktionen an.

[1]) G. Klein u. A. Zeller, Der Nachweis des Cholins in der Pflanze, Österr. bot. Ztschr. 1930, LXXIX, S. 49.

Betain

Phytomikrochemische Angaben über den Nachweis des Betains fehlen, auch in den Arbeiten von Staněk, Über die Lokalisation des Betains in der Pflanze (Sitzgsber. böhm. Ges., Prag, 1912, S. 1; Bot. Centralbl., 1912, CXX, S. 363; Böhm. Zeitschr. f. Zuckerind., 1913, XXXVII, S. 652; Bot. Centralbl., 1913, CXXIII, S. 152).

Zum mikrochemischen Nachweis können benützt werden: Die Verbindung mit Goldchlorid (Nadeln oder Blättchen F. 209°) und das auf Zusatz von Platinchlorid und Natriumjodid ausfallende Jodoplatinat (schwarze Rechtecke und rechtwinklige Kreuze).

Säureamide

Im Pflanzenreich kommen mehrere Säureamide vor, so Harnstoff und sein Derivat Allantoin, Asparagin und Glutamin. Ihre Bedeutung für die Pflanze liegt darin, daß sie, abgesehen davon, daß sie wiederum für Synthesen verbraucht werden können, durch Bindung und also Entgiftung des Ammoniaks entstehen, der im oxydativen Eiweißabbau gebildet wird[1]).

Im Laufe der Nacht findet in ausgewachsenen Blättern eine N-Auswanderung statt, an der die Amide wesentlich beteiligt sind. Der Gehalt der Blätter an löslichem Stickstoff insbesondere an Amiden hängt sowohl vom Alter der Blätter als auch von äußeren Bedingungen ab, von denen die Temperatur und der Kohlenhydratgehalt die wesentlichsten sind. Normalerweise findet in Blättern keine Amidbildung auf Kosten von Eiweiß statt. Kohlenhydratmangel veranlaßt ihre Entstehung, Kohlenhydrathunger das Auftreten von Ammoniak. Die Bildung der Amide in ausgewachsenen Blättern erfolgt durch Oxydation der hydrolytischen Spaltungsprodukte des Eiweiß (Mothes)[2]).

Harnstoff

Im Pflanzenreich und zwar bei Lycoperdon-Arten von Bamberger und Landsiedel zuerst aufgefunden (1903), dann von Goris und Mascré bei Tricholoma Georgii und Psalliota campestris, von Weyland in Coprinus stellaris und Coprinus diaphanus nachgewiesen. Der letztere fand ihn dann auch bei höheren Pflanzen, sowohl Mykotrophen (Listera ovata u. a.) als autotrophen (Aspidium filixmas und Equisetum silvaticum. Im Gegensatz zu Weyland[3]) konnte J. Weißflog[4]) keinen Harnstoff in mykotrophen Pflanzen nachweisen; es ist indes nicht ausgeschlossen, daß trotzdem sehr geringe Mengen vorkommen.

---

[1]) N. J. Iwanoff, Der Harnstoff der Pilze und dessen Bedeutung, Zeitschr. physiol. Chem., 1927, CLXX, S. 274; A. Kiesel, Der Harnstoff im Haushalt der Pflanze und seine Beziehung zum Eiweiß, Ergebnisse d. Biologie 1927, II, S. 257.

[2]) K. Mothes, Ein Beitrag zur Kenntnis des N-Stoffwechsels höherer Pflanzen, Planta, 1925, I, S. 472.

[3]) H. Weyland, Zur Ernährungsphysiologie mykotropher Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Botanik, 1912, LI, S. 1.

[4]) J. Weißflog, Untersuchungen über die angebliche Harnstoffanhäufung in mykotrophen Pflanzen, Planta, 1927, IV, S. 358.

Über die Physiologie des Harnstoffes s. K. Pirschle, Zur Assimilation des Harnstoffs durch die höhere Pflanze, Biochem. Ztschr., 1929, CCXIV, S. 466.

Fosse, der im Xanthydrol ein brauchbares Fällungsmittel für Harnstoff fand, erweiterte die Angaben über das Vorkommen des Harnstoffs beträchtlich. Er konnte ihn unter anderem bei einigen Samen (Zea Mays, Lupinns albus u. a.) nachweisen und auch in mehreren Keimlingen. Die Liste der harnstoffhaltigen Keimlinge wurde dann noch durch Tauböck[1]) erweitert. Klein u. Tauböck[2]) fanden Harnstoff in 45 von den von ihnen untersuchten 130 autotrophen Pflanzen.

Bei den Monokotylen tritt Harnstoff normalerweise nur in den Wurzeln auf.

Harnstoff entsteht bei Pilzen, wenn Stickstoff im Überschuß vorhanden ist und Mangel an Kohlenhydraten herrscht. Reife Champignons können bei künstlicher Zucht bis 13 % des Trockengewichts an Harnstoff enthalten (Iwanoff)[3]).

Nach Klein u. Tauböck (l. c.) hat Mangel oder Fütterung von anorganischem Stickstoff keinen Einfluß auf den für jede Pflanze charakteristischen Harnstoffspiegel (von 0 bis viel), dagegen verschwindet in sterilen Kulturen der Harnstoff (zuerst und gänzlich in den Wurzeln) durch Zugabe von Glykose. Von der grünen Pflanze wird Harnstoff leicht und unzersetzt aufgenommen.

Der Harnstoff F. 130—132° bildet vorzugsweise Prismen des tetragonalen Systems. Leichtlöslich in Wasser, gut in Weingeist, nicht in absolutem Äther und Chloroform. Säuren, Alkalien oder Urease hydrolysieren ihn zu Ammoniak und Kohlensäure. Schwerlöslich sind u. a. die Verbindungen des Harnstoffs mit Salpetersäure, Oxalsäure und besonders der mit Xanthydrol entstehende Dixanthylharnstoff. Doch fällt Xanthydrol noch eine Anzahl anderer N-haltiger Stoffe, so daß zur strengen Identifizierung die Bestimmung des Schmelzpunktes der entstandenen schwerlöslichen Verbindung nötig ist.

Man verwendet das Xanthydrol entweder in frisch bereiteter essigsaurer Lösung oder gibt es in festem Zustand zu der zu untersuchenden Lösung.

Der Dixanthylharnstoff fällt in Nadeln und Nadelbüscheln aus, auch in Sphärokristallen. Das überschüssige Reagens kann mit Weingeist und Essigsäure weggewaschen werden.

Unterschiede des Dixanthylharnstoffs gegenüber dem Monoxanthylallantoin. Das Harnstoffderivat schmilzt bei 261° und kann sublimiert werden[4]), das Allantoinderivat schmilzt bei 214° und sublimiert nicht. Außer-

---

[1]) K. Tauböck, Nachweis und Physiologie des Harnstoffes in der höheren Pflanze, Österr. bot. Zeitschr., 1927, LXXVI, S. 43.

[2]) G. Klein u. K. Tauböck, Physiologie des Harnstoffs in der höheren Pflanze, ebenda, S. 195.

[3]) N. J. Iwanoff, Über die Ausscheidung des Harnstoffs bei Pilzen, Biochem. Zeitschr., 1925, CLVII, S. 229; Über die Anhäufung und Bildung des Harnstoffs in Champignons, Biochem. Zeitschr., 1923, CXLIII, S. 62.

[4]) Die Sublimation kann am besten im Kleinschen Mikroapparat vorgenommen werden, sonst auch auf Schiefer- oder Asbestplatte. Die Hauptmenge sublimiert von 220° an in kleinen Platten, bei 240° ist die Sublimation beendigt.

dem ist letzteres leichter löslich in heißem Methanol (Dixanthylharnstoff ist nur in heißem Äthylalkohol löslich) und gibt mit Salzsäure eine Rotfärbung.

Allantoin selbst ist in Essigsäure so schwer löslich, daß die in einem Mikrotropfen essigsaurer Lösung vorhandene Allantoinmenge unterhalb der Erfassungsgrenze liegt.

Bei harnstoffreichen Geweben bringt man einen Schnitt oder ein kleines Stückchen in die Höhlung eines hohlen Objektträgers, bedeckt den Hohlschliff mit Schnitt etwa zu drei Viertel mit dem Deckglas, läßt Essigsäure durch eine Kapillarpipette einströmen, schiebt dann das Deckglas darüber und stellt in die feuchte Kammer. Der Nachweis wird nach einigen Stunden durch Zusatz von festem Xanthydrol geführt[1]).

Allgemeiner verwendbar ist die Extraktion im Mikroextraktionsapparat (s. S. 43). Man heizt langsam bis wenig über den Siedepunkt der Essigsäure an und extrahiert etwa 10 Minuten. Das Extrakt wird im hohlgeschliffenen Objektträger mit festem Reagens (wie oben) untersucht. Nach den an tierischem Material gemachten Erfahrungen ist die Lokalisationsermittlung mit Xanthydrol unsicher, da die entstehenden Kristalle die Größe der einzelnen Zellen übertreffen können und häufig auch außerhalb der Zelle beobachtet werden[2]).

Weyland extrahierte makrochemisch und wies den Harnstoff als Nitrat und Oxalat nach.

Thioharnstoff und Thioureid

Bei der Prüfung von etwa eine Woche alten Keimlingen von Cytisus laburnum L. (= Laburnum anagyroides Med.) erhielten Klein und Farkass[3]) bei der Prüfung auf Cytisin (s. d.) mit Platinjodid schwarze, metallisch glänzende Sternchen und am Rande des Deckglases gelbe polyedrische Kristalle, mit Platinbromid dunkelgelbe bis orange Prismen. Von allen untersuchten Stoffen gab nur Thioharnstoff dieselben

Die größeren Nadeln und Platten haben sich bei dieser Temperatur in kleine feine Stäbchen umgelagert.

[1]) Fosse gelang es in zwei Fällen erst nach Erwärmen, nicht aber ohne dieses, Harnstoff nachzuweisen. Compt. rend. 1926, CLXXXII, S. 175.

[2]) M. Bonnet u. J. Haushalter, Über die Sichtbarmachung von Harnstoff in den Geweben durch Xanthydrol, Ber. Ges. Physiol., XIII, 1922, S. 156. Walter Kurt, Die Bedeutung der Xanthydrolreaktion für den mikrochemischen Nachweis des Harnstoffs in der Niere, ebenda XIX, S. 481. J. Oliver, Mechanismus der Harnstoffabscheidung, ebenda VII, 68.

[3]) G. Klein u. E. Farkass, Der mikrochemische Nachweis der Alkaloide in der Pflanze, XIV, Der Nachweis von Cytisin, Österr. bot. Ztschr., 1930. LXXIX, S. 107.

Formen. Da auch dessen Reaktion mit Palladiumchlorür bejahend ausfiel, so betrachten sie den Nachweis des Thioharnstoffes als erwiesen.

Unter den Reaktionsprodukten, die mit Xanthydrol entstehen, trat bisweilen ein Produkt auf, das durch seinen tiefen Zersetzungspunkt (200°), die gelbe Färbung bei der Zersetzung und den dabei auftretenden Geruch nach Schwefeldioxyd auffiel. Danach scheint es sich um ein Thioureid zu handeln.

Allantoin (Glyoxyldiureid)[1]

In Sprossen der Platanen (Schulze u. Barbieri), Acerarten (Schulze u. Bosshard), Hülsen von Phaseolus vulgaris (Pfenniger), Rinde von Aesculus hippocastanum (Schulze), Weizen (Richardson u. Crampton), Rüben (v. Lippmann). Wurzeln von Mirabilis jalapa, oberirdischen Teilen von Stachys silvatica, Anchusa officinalis, Anabasis, Wurzeln von Anchusa officinalis, Keimlingen von Borago officinalis (Stieger), Symphytum officinale (Titherley u. Coppin), in Cordia excelsa (Peckolt, Thoms) und Symphytum officinale.

Der Gehalt an Allantoin, das wahrscheinlich ein Reservestoff ist, ist in dem Rhizom von Symphytum officinale am größten gegen Ende des Winters, am kleinsten im Sommer.

Glänzende, durchsichtige, schief abgeschnittene sechsseitige Prismen mit hexagonaler Grundform, oft in Drusen, unrein in Warzen und Körnern. F. 235° (Zers.). Schwerlöslich in kaltem Wasser, leichter in heißem, unlöslich in kaltem absol. Alkohol oder Äther, leichtlöslich in Natronlauge und kohlensauren Alkalien. Fällbar durch Quecksilbernitrat, sowie durch eine mit Natriumazetat neutralisierte oder schwach alkalisch gemachte Lösung von Quecksilberazetat.

Um Allantoin-Kristalle aus dem frischen Rhizom von Symphytum officinale zu erhalten, genügt es dickere Schnitte (1—2 mm) auf dem Objektträger mit Weingeist zu bedecken und das Deckgläschen mit Paraffin zu verschließen. Nach 48 Stunden findet man die Kristalle vor allem am Rand der Schnitte. Verwendet man ein Gemisch von 20 Teilen Essigsäure und 80 Teilen Alkohol, so findet man schon nach 12 Stunden gut ausgebildete Allantoin-Kristalle auf dem Parenchymgewebe. Man kann auch ein Verfahren benutzen, das von Molisch bei anderer Gelegenheit verwendet wurde: Zwischen zwei Glasplatten, die so übereinander gelegt werden, daß zwischen ihnen ein schmaler keilförmiger Raum entsteht, werden dickere Rhizomschnitte gelegt und mit Weingeist übergossen. Mit dem Verdunsten des Weingeists entstehen Allantoinkriställchen in garbenförmiger Anordnung.

[1]) A. Vogl, Untersuchungen über das Vorkommen von Allantoin im Rhizom von Symphytum officinale und anderer Boraginaceen. Pharmazeutische Post, 1918, LI, S. 183.

Mit der Mikrochemie hat sich Harvey-Gibson[1]) beschäftigt. Allantoin wird im Rhizom von Symphytum officinale mit Quecksilbernitrat nachgewiesen (weißer Niederschlag) und ist im Parenchym der Markstrahlen und der Rinde lokalisiert. Bei der Droge tritt die Reaktion nicht genügend scharf ein, so daß eine weitere Untersuchung erwünscht ist, die auch die Natur der Tröpfchen von „fettähnlichem" Aussehen aufzuklären hätte. Ferner scheinen kristallinische Ausscheidungen (nicht polarisierende Stäbchen) vorzukommen. Das Sublimat der Droge besteht aus Tröpfchen, die sich leicht in Wasser und in Weingeist lösen; aus der weingeistigen Lösung scheidet sich ein kleinkristallinischer Niederschlag ab. Salpetersäure färbt gelb. Wahrscheinlich sind im Sublimat Spaltungsprodukte von Allantoin zugegen.

Asparagin

Asparagin, das Amid der Aminobernsteinsäure, von Delaville 1802 in Asparagus aufgefunden, bildet sich vielfach im Stoffwechselprozeß. Reichlich findet es sich in Papilionaceen-Keimlingen, besonders in etiolierten (25 % der Trockensubstanz), aus denen man es auch darstellt (Lupinus, Vicia). Man gewinnt es aus dem wässerigen eingeengten Pflanzenextrakte, indem man die Eiweißstoffe durch Kochen abscheidet und die sich ausscheidenden Asparaginkristalle durch Umkristallisieren reinigt. Asparagin findet sich in Wurzeln (Glyzyrrhiza 2—4 %, Althaea 2 %, Symphytum officinale 1—3 %, Beta, Dahliaknollen u. a.), häufig in verdunkelten Zweigen und Knospen u. a. Pfeffer zeigte, daß bei der Verdunkelung zugleich mit der Anhäufung von Asparagin eine Abnahme an Zucker stattfindet[2]). In den Keimpflanzen fällt die Kurve des Eiweißzerfalls mit der der Asparaginbildung zusammen (Prjanischnikow). Es spielt bei der Eiweißsynthese eine Rolle, doch liefert es hierzu nicht das Hauptmaterial (Zalewski)[3]). Nach E. Schulze verwendet die Pflanze zur Asparaginbildung Bernsteinsäure. Asparagin ist das Analogon des Harnstoffs der Tiere, beide Stoffe sind in ihrer Hauptmasse keine primären Produkte der hydrolytischen Eiweißspaltung, sondern bilden sich auf sekundärem Wege, wobei zu ihrer Synthese vor allen Dingen das Ammoniak dient, welches durch Oxydation der Aminosäuren erhalten wird. Der physiologische Sinn ist in beiden Fällen die Entgiftung des Ammoniaks. Das

[1]) R. J. Harvey-Gibson, Pharm. Journ., 1912, LXXXVIII, S. 91.

[2]) Tichomirow hat bei den zahlreichen auf Zucker untersuchten Pflanzen (s. Glykose) nur bei Lemna und Atropa keinen Zucker gefunden, bringt hierfür jedoch keine Erklärung; diese erscheint nach obigem naheliegend. Atropa führt Asparagin, womit weiter in Einklang steht, daß sie typische Schattenpflanze ist.

[3]) Vgl. Zalewski, Ber. bot. Ges., 1898, XVI, S. 146. — Prjanischnikow, Ber. bot. Ges., 1899, XVII, S. 151. — Pfeffer, Jahrb. f. wiss. Bot., 1872, VIII, S. 533. — Löw, Chem. Ztg., 1896, XX, Nr. XVI. — Die zahlreichen Arbeiten von E. Schulze und seinen Schülern, in Landwirtsch. Versuchsst., Ber. bot. Ges., 1907, XXV, S. 213 u. a.

Asparagin kann bei reichlicher Zufuhr von Kohlenhydraten später wieder zum Aufbau von Eiweißmolekülen dienen (Prjanischnikow)[1]).

Über die fermentative Desamidierung des Asparagins durch Aspergillus niger s. K. Schmalfuß und K. Mothes, Biochem. Zeitschr., 1930, CCXXI, S. 134.

l-Asparagin bildet farblose rhombische linkshemiëdrische Säulen F. 226—227° (im geschlossenen Rohr unter Zers.). Löslich in 55,8 Teilen Wasser von 10,5° und in 1,9 Teilen siedendem. Unlöslich in kaltem absolutem Alkohol.

Aus wässeriger Lösung fällt mit Kupferazetat — am besten nach Zusatz von Weingeist — das Kupfersalz u. a. als lebhaft polarisierende Rauten und schiefwinklige Prismen.

Da Asparagin in den lebenden Zellen in gelöster Form auftritt und sehr leicht in Wasser, dagegen kaum in Weingeist löslich ist, so benutzt man in erster Linie Weingeist zum mikrochemischen Nachweis. Vorteilhaft bedient man sich frischen Materials und benutzt zu Demonstrationszwecken Spargel oder 2—3 cm dicke Dahlienknollen, auch etiolierte Keimlinge und Althaeawurzeln. Die etwa 0,3—0,5 mm starken Präparate kommen auf dem Objektträger in absoluten Alkohol und werden mit dem Deckglas bedeckt. Nach dem völligen Verdunsten des Alkohols hat sich Asparagin in Täfelchen ausgeschieden. Überwiegend bilden sich rhombische Täfelchen mit stumpfen Winkeln und abgestutzten Ecken. Zum Teil wird die Kristallform von der Art der Verdunstung und der Menge des vorhandenen Asparagins beeinflußt. Bei sehr langsamem Verdunsten und bei Gegenwart von reichlichen Mengen resultieren auch Nadeln, bei sehr schnellem Verdunsten federartige Skelette. Die Kristalle sind unlöslich in Chloroform, Benzol, ätherischen Ölen, lösen sich leicht in verdünnten Säuren, Ammoniak, Chloralhydrat und Kalilauge. Die Angabe von Walliczek[2]), daß Asparagin in Ammoniak und Kalilauge unlöslich sein soll, trifft weder für die Handelsware noch für die mit Alkohol aus Pflanzen gefällten Asparaginkristalle zu (Fig. 62).

Die sich gleichzeitig ausscheidenden Kaliumnitratkristalle stellen ähnliche Täfelchen dar, die aber nicht so regelmäßig auskristallisieren und nur rechte Winkel zeigen[3]) (Fig. 62c). Zur weiteren Unterscheidung von Kaliumnitratausscheidungen stehen zwei Methoden zur Hand. Kaliumnitratkristalle geben eine Salpetersäurereaktion, lösen sich somit

[1]) D. Prjanischnikow, Asparagin und Harnstoff, Biochem. Zeitschr., 1924, CL, S. 407.

[2]) H. Walliczek, Studien über den Membranschleim vegetat. Organe, Dissert. Bern, 1893, S. 50, Jahrb. f. wiss. Bot., 1893, XXV, S. 209.

[3]) A. Zimmermann, Mikrotechnik, 1892, S. 80, Anm.

mit tiefblauer Farbe in Diphenylaminschwefelsäure[1]) oder rot in Brucinschwefelsäure. Um aber einen sicheren Schluß fällen zu können, muß der Zusatz der Reagentien sehr vorsichtig geschehen, so daß man die Reaktion unter dem Mikroskop genau verfolgen kann. Andererseits läßt sich Borodins Verfahren[2]) zur Differentialdiagnose verwenden. Es müssen bei Zusatz einer gesättigten wässerigen Asparaginlösung die Asparaginkristalle an Größe zunehmen, die Kaliumnitratkristalle sowie alle anderen wasserlöslichen Substanzen im Wasser des Reagens aber gelöst werden. Andere in Wasser schwerlösliche Ausscheidungen, wie Tyrosin, bleiben hierbei erhalten, wachsen aber nicht. Tyrosin (s. d.) wird überdies durch Millons Reagens rot. Eine gesättigte Kaliumnitratlösung kann man zur Borodinschen Methode wegen der großen

Fig. 62. Asparaginkristalle *a*) aus dem Handelspulver deutscher Althaeawurzel, *b*) aus Atropa belladonna (Blatt) mit Alkohol gefällt; *c*) Salpeterkristalle aus Nicotiana tabacum (Stengel) mit Alkohol gefällt (Tunmann)

Löslichkeit des Kaliumnitrats nicht anwenden. Doch fand Tunmann, daß sich die Salpeterkristalle weit leichter in Wasser lösen als Asparagin. Bei kräftigem Anhauchen und sofortiger mikroskopischer Kontrolle sind meist die Salpeterkristalle verschwunden, während die Asparaginkristalle erhalten bleiben; erstere kann man nach wenigen Augenblicken wieder anschießen sehen. — Schließlich lassen sich die Erscheinungen, die beim Erhitzen der Kristalle auftreten, zur Unterscheidung heranziehen. Erwärmt man die aus Alkohol gewonnenen und am Deckglas haftenden Asparaginkristalle bis auf etwa 100°, dann lösen sie sich in ihrem Kristallwasser und bilden ölartige Tröpfchen, die wasserlöslich sind; beim Erhitzen der Kristalle (auf 200°) entstehen braune, schaumige, in

[1]) C. O. Müller, Ein Beitr. z. Kenntnis d. Eiweißbild. in d. Pflanzen, Dissert. Leipzig, 1886, auch Serno, Landwirtsch. Jahrb., 1889, S. 877.

[2]) Borodin, Über d. phys. Rolle u. d. Verbreit. d. Asparagins im Pflanzenreiche, Bot. Ztg., 1878, XXXVI, S. 801.

Wasser unlösliche Massen. Kaliumnitrat wird beim Erwärmen bis auf 100^0 nicht zersetzt, die Nitratkristalle sind nach dem Abkühlen wieder sichtbar.

Beim Einlegen größerer lebender Pflanzenteile (junge Süßholzwurzeln) in Weingeist scheidet sich Asparagin auch in Form kleiner dendritischer Kristalle oder feiner Nädelchen aus. Letztere gruppieren sich bisweilen um einen Punkt und bilden sphärokristallinische Gebilde. Derartige Ausscheidungen finden wir, wenn wir die aus Weingeistmaterial hergestellten Schnitte direkt in Weingeist beobachten[1]), Sphärokristalle trifft man häufig im Handelspulver der deutschen Althaea an (Fig. 62a). Es erscheint aber fraglich, ob in ihnen das Asparagin in reiner Form vorliegt, denn diese Bildungen reagieren zwar positiv nach Borodin, lösen sich aber schwer in verdünnten Alkalien. Keineswegs gelangen auf diese Weise die gesamten Asparaginmengen zur Kristallisation. Diese kann nämlich durch Polysaccharide (Schleim, Gummi, Inulin) mehr oder weniger gehindert werden, bisweilen ganz unterbleiben. Man bringt in solchen Fällen die Kristallisation derart zustande, daß man 1 cm starke Pflanzenteile in Weingeist legt. Schon in wenigen Tagen pflegen sich auf den Schnittflächen bis 1 mm große Kristalle (rhombische Säulen) auszuscheiden. Die mit Kristallen bedeckte Schnittfläche des Pflanzenstückes wird zum mikroskopischen Präparate benutzt. Die Angabe Leitgebs[2]), daß auch Glyzerin die Kristallisation hindere, gilt für konzentriertes Glyzerin wenigstens nicht. Denn bei lebend in konzentriertes Glyzerin eingelegten dicken Präparaten der Süßholzwurzel fand Tunmann oft Asparaginkristalle (Sphärokristalle) und Belzung[3]) fand beim Einlegen in reines Glyzerin in den Interzellularräumen rhombische und rechteckige (?) Tafeln von Asparagin. Dann ist das Asparagin nicht mehr am Orte seiner Entstehung.

Zur Auffindung geringer Asparaginausscheidungen bedient man sich des polarisierten Lichtes. Die Kristalle treten dann farbig leuchtend deutlich hervor. Salpeter leuchtet im allgemeinen nicht so lebhaft, nur die größeren Kristalle zeigen blaue und rote Polarisationsfarben.

Glutamin (Glutaminsäureamid)

d-Glutamin ist das völlige Analogon des Asparagins und kommt häufig mit diesem zusammen vor.

[1]) Dahmen, Über den Funiculus der Samen, Dissert. Erlangen, 1891, S. 12.

[2]) H. Leitgeb, Der Gehalt d. Dahliaknollen an Asparagin u. Tyrosin, Mitt. bot. Inst., Graz 1888, Heft 2, S. 215.

[3]) E. Belzung, Sur divers principes d. l. germination et leur cristallisation intracellulaire, Journ. de Bot., 1892, VI, S. 49.

Farblose rhombische Tafeln. Löslich in 25 Teilen Wasser von 16°. Gibt ein schwerlösliches Kupfersalz.

Glutamin wird man relativ leicht beim Asparaginnachweis mittels Alkohol erhalten (Stachysknollen, Vicia- und Cucurbita-Keimlinge), wenn man die Alkoholpräparate einige Tage im Exsikkator austrocknet. Die Glutaminnadeln lösen sich sehr leicht in Wasser (beim Anhauchen), sind aber in absolutem Alkohol unlöslich.

Aminosäuren

Die Aminosäuren sind Bausteine des Eiweiß. Sie treten in größerer Menge da in freiem Zustand auf, wo Eiweiß ab- und aufgebaut wird, besonders in Keimlingen und reifenden Samen. Glykokoll, Alanin, Valin, Leuzin, Phenylalanin, Tyrosin, Glutaminsäure sind sublimierbar. Zur Identifizierung der einzelnen Aminosäuren können ihre Kristallform, sowie die ihrer Verbindungen mit Phosphorwolframsäure und Kupfer dienen. Näheres siehe O. Werner. Die mikrochemische Charakterisierung der wichtigsten α-Monoaminosäuren, Mikrochemie 1923, I, S. 33.

Ein ziemlich allgemeines Reagens auf Aminosäuren ist das Ninhydin = Triketohydrindenhydrat (Ruhemann, Abderhalden). Mit Aminosäuren, welche eine freie Aminogruppe und eine freie Karboxylgruppe besitzen, gibt es eine Blaufärbung, die rasch beim Erwärmen, langsamer in der Kälte eintritt. Mit einer Lösung von 0,1 g Ninhydrin in 10 ccm Wasser liefern nach O. Loew[1]) bei Zimmertemperatur, Glykokoll, Alanin, Leuzin und Histidin in 15 Minuten eine ziemlich starke blaue Färbung, Lysin und Arginin in etwa 20 Minuten, Asparaginsäure und Glutaminsäure in etwa 2 Stunden, Phenylalanin in 3 Stunden; Tyrosin reagierte nach 24 Stunden noch nicht. Asparagin liefert nur eine rötlich-gelbe Färbung, die durch Kochen tief rotbraun wird. Man kann die Schnitte direkt in die Ninhydrinlösung bringen und entweder in der Kälte beobachten oder kurz erwärmen.

Leucin

Entdeckt von Proust 1818; v. Gorup-Besanez fand Leucin (α-Aminoisocapronsäure) in Vicia-Keimlingen auf, in denen es sich, ebenso wie in den Keimlingen von Lupinus luteus und manchen anderen Pflanzen anhäufen kann. Im allgemeinen findet es sich aber nicht in großen Mengen. Es wird angegeben für die Knospen der Roßkastanie (Schulze), für Kartoffeln (Schulze, Barbieri), Zuckerrüben (Lippmann), Phaseolus, Cucurbita (Schulze), Secale cornutum (Burgermeister und Buchheim), Hefe (Schützenberger), die

[1]) O. Loew, Ninhydrin als mikrochemisches Reagens auf Aminosäuren, Flora, 1918, N. F., X, S. 262.

Sorghum-Pflanze (Willaman und Mitarbeiter u. a.[1]). Bei der Hydrolyse der Eiweißkörper entsteht Leucin in größerer Menge. Reines Leucin schmilzt bei 293 bis 295° (E. Fischer), unreines Präparat bei 170°. Leucin ist unlöslich in Äther und Chloroform, sehr schwer löslich in Weingeist, leicht löslich in Wasser und bildet farblose, glänzende Blättchen. Es ist ein wichtiger Baustoff und pflegt Asparagin zu begleiten.

Um Leucin mikroskopisch zur Anschauung zu bringen, was aber nicht immer gut gelingt, benutzt man frische Dahliaknollen oder junge Pflänzchen von Lupinus luteus, Vicia u. a. Die nicht zu dünnen Präparate kommen in einen Tropfen Weingeist; beim Verdunsten scheidet sich (neben Asparagin und anderen Aminokörpern) Leucin in Form sehr kleiner Schuppen aus. Von den anderen Ausscheidungen kann man nun Leucin durch Sublimation trennen (Borodin)[2]. Man läßt das Weingeistpräparat einige Zeit offen liegen, um es ganz eintrocknen zu lassen, bedeckt es dann mit dem Deckgläschen und erhitzt bis auf etwa 170°. Hierbei sublimiert Leucin meist ohne Zersetzung. Die Leucinkristalle haften nun am Deckgläschen und können mit diesem entfernt werden, Asparagin findet sich nach dem Erhitzen im Präparate in schaumig-öligen Tropfen, Kaliumnitrat scheidet sich beim Erkalten wieder kristallinisch aus. Da aber bei dieser Vorschrift Borodins das Deckglas des Trockenpräparates selbst bei vorsichtigem Erhitzen oft abgeschleudert wird (Tunmann), so ist es vorteilhafter, in der üblichen Weise auf der Asbestplatte bei möglichst niedrigem Sublimationsraum zu sublimieren.

Im Präparate selbst kann Leucin mit Borodins Methode identifiziert werden; die Leucinkriställchen wachsen in einer konzentrierten wässerigen Leucinlösung, alle anderen hier in Betracht kommenden Aminokörper und Kaliumnitratkristalle werden gelöst. Läßt man frische Präparate längere Zeit unter Deckglas in Glyzerin liegen, dann scheidet sich Leucin in ganz charakteristischen, herzförmigen Lamellen aus, die ebenfalls mit Leucinlösung identifiziert werden können, zuweilen Sphärokristalle bilden und sich in reichlicher Menge in Keimlingen finden (Lupinus albus). Nach Belzung[3]) gelangt es auch in den Interzellularräumen zur Kristallisation.

Tyrosin (und Homogentisinsäure)

Entdeckt von Liebig 1846. Tyrosin (Paraoxyphenylalanin), ein weit verbreiteter Baustoff der pflanzlichen Eiweißkörper, bildet feine Nadeln, die zu Garben

[1]) Über die Verbreitung von Leucin s. Abderhaldens Biochemisches Handlexikon, IV, S. 544, XI, S. 120.

[2]) Borodin, Über Sphärokristalle aus Paspalum elegans und über die mikrochem. Nachweisung von Leucin, Bot. Zentralbl., 1884, XVII, S. 102.

[3]) E. Belzung, Sur divers principes issus de la germination et leur cristallisation intracellulaire, Journ. de Bot., 1892, VI, S. 49.

vereinigt sind, sich schwer in kaltem Wasser, leicht in heißem Wasser und in Alkalien, nicht in Weingeist und in Äther lösen und sich bei 314—318° zersetzen. Tyrosin ist aufgefunden in Kartoffeln (Schulze), in Apium (Bamberger), in der Zuckerrübe (von Lippmann), in Knollen von Dahlia (Leitgeb) und Stachys tuberifera (Planta), in Schößlingen japanischer Bambusen (Shibata), im Safte der Holunderbeeren (Tollens), in Trifolium (Orloff), in Keimlingen (mikrochemische Versuchsobjekte) von Lupinus, Vicia, Cucurbita u. a.[1]) Es tritt vorzugsweise in den ersten Keimungsstadien auf, wird aber bald durch die Tyrosinase, die am Wurzelhals und in den basalen Teilen des Hypokotyls ihren Sitz hat, weiter verändert. Hierbei entsteht unter Sauerstoffaufnahme und unter Ammoniakabspaltung stickstofffreie Homogentisinsäure (Gonnermann, Bertel), die in weitere Oxydationsprodukte übergeht. Aus den Samenproteiden wird es in einer Ausbeute bis zu 3 % erhalten. Tyrosin kommt auch in Pilzen vor (Basidiomyceten, Secale cornutum). Verschiedentlich wurde es in den Membranen angegeben, so von Saito. Bei Fäulnisprozessen wird es zersetzt.

Der mikrochemische Nachweis des Tyrosins ist leichter zu erbringen, als der anderer Aminosäuren. Man legt die aus frischem Material hergestellten Schnitte auf dem Objektträger in einige Tropfen Weingeist; nach dem Verdunsten des Weingeists scheidet sich Tyrosin in feinen doppelbrechenden Nadeln aus, die zu Garben und Büscheln vereinigt sind (Borodin)[2]), sowie oft in Doppelpinselform auftreten[3]). Die sich hierbei in verschiedenen Objekten gleichzeitig bildenden Kristalle von Asparagin (S. 281), Kaliumnitrat (S. 137, Leucin (S. 284) sind niemals Nadeln, sondern Blättchen. Diese Blättchen lösen sich überdies sehr leicht in Wasser, ebenso die in Nadeln sich abscheidenden Glutaminkristalle (S. 283) in Cucurbita, sowie Mannitkristalle (S. 209). Setzt man ammoniakhaltigen Weingeist (1,0 Ammoniak, 10,0 Weingeist) zu, dann gehen Tyrosinkristalle in Lösung, um sich bald in Garben wieder auszuscheiden. Sie lösen sich in Millons Reagens mit tiefroter Farbe (Nasse[4]), ebenso verhalten sich alle Eiweiß-Substanzen (s. d.), die Tyrosin enthalten) und geben die Xanthoproteinreaktion. Bei vorsichtigem Eindampfen mit Salpetersäure entsteht ein gelber Rückstand, der bei Zusatz von Natronlauge eine gelbrötliche Lösung bildet, aus der sich rote, undeutlich kristallinische Massen abscheiden.

[1]) Weitere Angaben über die Verbreitung des Tyrosins siehe Abderhaldens Biochemisches Handlexikon, IV, S. 681, XI, S. 166.

[2]) Borodin, Über d. phys. Rolle und die Verbr. d. Asparagins im Pflanzenreiche, Bot. Ztg., 1878, XXXV, S. 816, und Über einige b. Bearbeit. v. Pflanzenschnitten mit Alkohol entstehende Niederschl., Bot. Ztg., 1882, XXXIX, S. 591.

[3]) K. Shibata, Beiträge zur Wachstumsgeschichte der Bambusgewächse, Journ. College of Sc. Tokyo, 1900, XIII, S. 427.

[4]) O. Nasse, Pflüg. Archiv, 1901, LXXXIII, S. 361.

In den Präparaten lassen sich noch folgende Reaktionen benutzen. Beim Erwärmen der Kristalle mit Formalin-Schwefelsäure erfolgt Grünfärbung (Mörner)[1]. Auch Froehdes Reagens (eine durch Erwärmen frisch bereitete Lösung von 0,01 g molybdänsaurem Natrium in 1,0 ccm konzentrierter Schwefelsäure) hat Tunmann brauchbar gefunden; es löst die Kristalle mit tiefblauer Farbe, die bald violett wird. Umständlicher, aber schärfer (Empfindlichkeitsgrenze 0,01 μ g) ist Azetaldehyd-Schwefelsäure (rosa bis rote Färbung). Die weingeistige Tyrosinlösung wird mit einem Tropfen Schwefelsäure und mit zwei kleinen Tropfen Azetaldehyd (5 ccm : 10 ccm Alkohol) versetzt. Aus frischen Präparaten, die einige Tage unter Deckglas in wenig Glyzerin gelegen haben, kristallisiert Tyrosin ebenfalls aus. Es häuft sich in einigen Zellen des Gewebes an (mit Garben und Büschel erfüllte Zellkomplexe). Nach Leitgeb[2]) soll Inulin das Auskristallisieren des Tyrosins in Dahliaknollen verhindern können. In solchen Fällen lassen sich Tyrosinkristalle erzielen, wenn man in ein kleines Präparatengläschen ein, den Raum das Gläschens annähernd ausfüllendes, mindestens 0,5 cm hohes Stück der Dahliaknollen stellt und das Gläschen zur Hälfte mit Weingeist füllt. Auf der oberen aus dem Weingeist hervorragenden Schnittfläche sammelt sich Tyrosin in großen Kristallen an, die nach den oben angegebenen Methoden identifiziert werden können.

In, einige Tage alten, Keimlingen (Lupinus luteus u. a.) lassen sich Tyrosinkristalle durch Asphyxie erzeugen (Bertel)[3]. In Wurzel und Hypokotyl erfüllen die bis 10 μ großen, schwach doppelbrechenden, gelblich-weißen Sphärite die Zellen stellenweise völlig. Die Tyrosinregion reicht ununterbrochen vom Hypokotyl bis an die Wachstumszone der Wurzel. Die Wurzelhaube ist frei von Tyrosin, hingegen finden sich große Mengen in der Plumula. Die Tyrosinabscheidung läßt sich an Präparaten hervorrufen durch Chloroform, Benzol, Toluol, Weingeist und Äther. Man bringt Schnitte aus der mittleren Wurzelregion auf dem Objektträger in einen Tropfen Wasser, legt einen Pappausschnitt als feuchte Kammer auf (S. 22) und bringt auf das Deckglas einen Tropfen Chloroform, Äther o. dgl. Die Dämpfe des hängenden Chloroformtropfens müssen die Schnitte bestreichen. Nach 30—60 Minuten haben sich nadelförmige, kranzartig gruppierte Tyrosinkristalle gebildet. Durch die Narkose wird jedenfalls die weitere Verarbeitung des Tyrosins

[1]) Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1902, XXXVII, S. 86.

[2]) H. Leitgeb, Der Gehalt d. Dahliaknollen an Asparagin und Tyrosin, Mitt. bot. Inst. Graz, 1888, I, S. 215.

[3]) E. Bertel, Über Tyrosinabbau in Keimpflanzen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1902, XX, S. 454.

verhindert, während die Wirkung proteolytischer, Tyrosin bildender Enzyme nicht gehemmt wird.

In den Tyrosinzellen der Keimwurzeln tritt mit ammoniakalischer Silbernitratlösung keine Reduktion ein, doch erfolgt die Millonsche Reaktion. Wird jedoch die Narkose auf mehrere Tage ausgedehnt, dann verschwinden die Kristalle, die Millonsche Reaktion bleibt aus und die Silberreduktion tritt, besonders beim Erwärmen, deutlich hervor. Der die Reduktion bedingende Körper, der sich vornehmlich im Periblem findet, soll nach Czapeks[1]) eingehender Untersuchung Homogentisinsäure sein. die sich aus Tyrosin bildet. Wahrscheinlich deutet die Beobachtung von Pfeffer[2]), daß Wasserstoffperoxyd (neutral oder ganz schwach alkalisch) eine rötlichbraune Färbung hervorruft (Keimwurzel von Vicia faba), ebenfalls auf Homogentisinsäure hin.

Czapek weist Homogentisinsäure in Lupinenwurzeln nach, indem er eine größere Menge Wurzeln zunächst in einem geschlossenen Glase mehrere Tage im Brutschrank beläßt. Dann werden die Wurzeln unter Zusatz von Glaspulver zerrieben, der Wurzelbrei wird mit 96proz. Weingeist ausgekocht. Das weingeistige Extrakt wird eingeengt, mit Wasser verdünnt, der Weingeist verjagt und die wässerige Lösung filtriert. Die Lösung enthält die Homogentisinsäure, sie wird mit Alkalien rötlichgelb bis dunkelbraun, reduziert ammoniakalische Silberlösung, wird beim Erwärmen mit Millons Reagens gelbrötlich, mit Ferrichlorid grünlich, mit Eisenvitriol violett. Sie wird durch Bleiazetat gefällt, Fehlingsche Lösung wird erst bei längerem Kochen etwas reduziert. Reine Homogentisinsäure gibt ähnliche Reaktionen. — Da aber Schulze und Castoro[3]) Homogentisinsäure nicht isolieren konnten, trotzdem sich diese, künstlich den Pflanzen zugesetzt, noch in Spuren von 0,005 % nachweisen läßt, so bleibt die Frage strittig.

Histidin

Histidin ist ein Bestandteil der meisten Eiweißstoffe.

Farblose Blätter F. 253° (u. Zers.). Leicht in Wasser löslich, schwer in Weingeist, nicht in Äther. Fällbar durch Phosphorwolframsäure, Merkurisulfat und Silbernitrat + Ammoniak oder Barytwasser.

Histidin gibt mehrere Farbenreaktionen, von denen Brunswik[4]) die Rotfärbung zum mikrochemischen Nachweis heranzieht, die Histidin

[1]) Fr. Czapek, Oxydative Stoffwechselvorgänge bei pflanzlichen Reizreaktionen, Zeitschr. f. wiss. Bot., 1906, XLIII, S. 361.

[2]) W. Pfeffer, Beiträge zur Kenntnis der Oxydationsvorgänge in lebenden Zellen, Leipzig, 1889, S. 8.

[3]) E. Schulze u. N. Castoro, Bildet sich die Homogentisinsäure beim Abbau des Tyrosins in den Keimpflanzen?, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1906, XLVIII, S. 396.

[4]) H. Brunswik, Über den eindeutigen makro- und mikrochemischen Nachweis des Histidins am Eiweißkomplex, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1923, CXXVII, S. 268.

mit Diazobenzolsulfosäure in sodaalkalischer Lösung gibt (Paulysche Reaktion).

Die Schnitte (am besten von Alkoholmaterial) werden schwach mit 33proz. Salpetersäure erwärmt[1]), dann nach kurzem Abspülen mit Wasser in eine konzentrierte Sodalösung gebracht. Nachdem das Eiweiß orangegelb geworden, versetzt man unter Deckglas mit frisch bereitetem sodaalkalischem Diazoreagens[2]). Alle histidinhaltigen Eiweißteilchen werden ziegelrot. Hatte man sich vorher überzeugt, daß es sich um Eiweiß handelt, so ist diese Reaktion eine eindeutige Mikroreaktion auf Histidin.

Tryptophan

Das Tryptophan (Hopkins u. Cole) bildet glänzende Blättchen F. ca. 289°. Leicht in heißem, schwer in kaltem Wasser löslich, auch in heißem Weingeist wenig löslich.

Kupfersalz, Pikrat und Pikrolonat sind schwer löslich. Gibt viele Farbenreaktionen, so mit aromatischen Aldehyden und konzentrierten Säuren. Die Violettfärbung, die eiweißhaltige Schnitte mit Vanillin-Salzsäure geben, ist eine Tryptophan-Reaktion[3]).

Der mikrochemische Nachweis ist von Kretz bearbeitet worden[4]).

Die Schnitte müssen zunächst in Sublimat oder Formalin gehärtet werden und zwar empfiehlt sich die zeitraubendere Formalinhärtung nur zur Untersuchung feinerer Details, um so mehr als sie bei nicht richtiger Ausführung den späteren Nachweis stört.

Zur Sublimathärtung läßt man eine 2proz. Sublimatlösung 10—15 Minuten einwirken, man kann die Schnitte, ohne sie vorher auszuwaschen, zu der Reaktion verwenden.

Zur Formalinhärtung werden die Schnitte auf mindestens eine halbe Stunde in 2- bis höchstens 5proz. Formalinlösung eingelegt und dann 2 Stunden in fließendem Wasser gründlich gewaschen. Größere Präparate müssen längere Zeit fixiert und gewaschen werden.

[1]) Die Nitrierung erfolgt, um eine Verwechslung mit Tyrosin, das in unnitriertem Zustand ebenfalls die Diazoreaktion gibt, auszuschalten.

[2]) 2 g Sulfanilsäure, die in einem Gemisch von 3 ccm Wasser und 2 ccm konzentrierter Salzsäure aufgeschwemmt sind, werden vorsichtig in kleinen Anteilen mit einer Lösung von 1 g Natriumnitrit in 2 ccm Wasser versetzt. Die sich bildende Diazobenzolsulfosäure wird abfiltriert und mit wenig Wasser nachgewaschen.

[3]) L. Rosenthaler, *Vanillin-Salzsäure als Reagens auf Eiweiß und Tryptophan*, Apoth. Ztg., 1907, XXII, S. 678.

[4]) F. Kretz, Über den mikrochemischen Nachweis von Tryptophan in der Pflanze, Biochem. Zeitschr., 1922, CXXX, S. 86.

Die fixierten Schnitte werden 3—5 Sekunden in eine wässerige Lösung von Natriumsilikat (Dichte 1,10) gebracht, dann 1—2 Sekunden in destilliertem Wasser abgespült und mit Glasnadeln in das Reagens von Voisenet[1]) übertragen. Nach 10—15 Minuten unter Umständen erst nach ½ Stunde werden die Schnitte mit Glasnadeln vorsichtig auf einen Objektträger in einen Tropfen Paraffinöl übertragen und mit einem Deckglas bedeckt. Bei positivem Ausfall ist violette Färbung vorhanden.

Im Grundgewebe fehlt Tryptophan oder ist nur in sehr geringer Menge vorhanden. In allen eiweißreichen Geweben ist es reichlich zu finden, auch in manchen Idioblasten wie den sog. Myrosinzellen der Cruciferen; es ist im Protoplasma und allen eiweißhaltigen Zelleinschlüssen, Kern, Nukleolus, Aleuron, in Eiweißkristallen und dem Chloroplastenstroma nachweisbar.

Glutathion

Das Glutathion ist ein Tripeptid aus je 1 Mol. Glutaminsäure, Glykokoll und Cystin. Es ist ein in allen atmenden Zellen vorhandener Oxydationskatalysator (Hopkins 1920). Das in ihm vorhandene Cystinmolekül hat die Fähigkeit, Wasserstoff unter Bildung von SH aufzunehmen; die Oxydation zur S-S-Gruppe geht nur bei Gegenwart von Eisen vor sich (Zusammenhang mit dem Warburgschen Atmungsferment). Schwerlöslich ist das Kupfersalz.

Über die Bedeutung des Glutathions s. auch Ph. Joyet-Lavergne, Protoplasma 1929,VI, S. 84.

Reaktionen zum Nachweis des Glutathions hat A. Heffter (Med. naturw. Archiv 1908, I, 81) angegeben. Es gibt mit alkalischer Nitroprussidlösung Rotfärbung, mit Pikrinsäure (gesättigte mit der doppelten Menge Wasser verdünnte Lösung) Rosafärbung. Joyet-Lavergne[2]) gibt ferner an, daß es mit 2proz. Ferrichloridlösung eine graue oder schwarze Färbung gibt. Derselbe Autor gibt mehrere Modifikationen für die Ausführung der Nitroprussidreaktion an.

1. Präparat erst 5 Minuten in 10proz. wässerige Kaliumcyanidlösung, dann auf dem Objektträger in die Cyanidlösung, dazu einen Tropfen frisch bereitete 5proz. Nitroprussidlösung. 2. Präparat 10 Minuten in gesättigte wässerige Lösung von Natriumsulfit, dann auf den Objektträger in die Natriumsulfitlösung, dazu Nitroprussid und einen Tropfen Ammoniak. 3. Präparat ¼ Stunde in gesättigte wässerige

[1]) 1 Tropfen 2proz. Formaldehyd, 1 Tropfen 0,5proz. wässerige Lösung von Natriumnitrit, 10—15 ccm Salzsäure (D. 1,19).

[2]) Ph. Joyet-Lavergne, Sur quelques procédés de recherches microscopiques du glutathion dans les cellules, Compt. rend. soc. biol., 1928, XCVIII, S. 658.

Lösung von Ammonsulfat, dann auf dem Objektträger mit Nitroprussid und Ammoniak versetzt. 4. Präparat 2—5 Minuten in 2proz. Trichloressigsäure, dann auf dem Objektträger mit Nitroprussid und Ammoniak versetzt.

Kohlenhydrate

Zum allgemeinen Nachweis von Kohlenhydraten (auch in glykosidisch gebundener Form) dienen die Reaktionen von Molisch[1]). Er fand, daß Zuckerlösungen, mit einigen Tropfen einer 15—20proz. weingeistigen α-Naphthollösung und Schwefelsäure versetzt, eine violette Farbenreaktion geben. Nachfolgender Wasserzusatz bedingt einen blauvioletten Niederschlag. Zuckerlösungen in gleicher Weise mit Thymol-Schwefelsäure behandelt, werden zinnoberrot. Derart lassen sich noch 0,00001 % Zucker nachweisen. Rohrzucker, Milchzucker, Traubenzucker, Fruchtzucker, Maltose geben die Reaktion, nicht aber Inosit. Auch mit höheren Kohlenhydraten und mit Glykosiden erhält man die gleichen Farbenreaktionen. Doch wird die Reaktion, die bei Hexosen auf der Bildung von Oxymethylfurfurol beruht, in ähnlicher Weise auch durch Vanillin und Eiweißsubstanzen hervorgerufen (Nickel)[2]), die Kohlenhydrate enthalten. Zur Ausführung der Reaktion bringt man nicht zu dünne Präparate auf dem Objektträger in einen Tropfen einer 15—20proz. weingeistigen α-Naphthollösung und fügt 2—3 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure hinzu, so daß der Schnitt von der Säure völlig bedeckt ist. Bei Anwesenheit von Traubenzucker, Fruchtzucker, Rohrzucker, Inulin wird der Schnitt augenblicklich violett. Weiteren Aufschluß liefern nun Vergleichspräparate. Man stellt zwei gleiche Schnitte her, entfernt aus dem einen durch kurzes Aufkochen in Wasser den Zucker und führt dann mit beiden Schnitten auf einem Objektträger die Reaktion aus, die jetzt in dem gekochten Schnitt viel später eintreten wird. Gegenwärtig benutzt man die Reaktion, der nur ein orientierender Wert zukommt, nur selten.

Die von Kraus[3]) angegebene sogenannte „morphologische Methode“, die darin besteht, daß man die zu prüfenden Objekte in Glyzerin oder Weingeist einträgt (Ausscheidung der Zuckerarten in Tröpfchen), wird man nur gelegentlich nebenbei als Hinweis berücksichtigen, falls nämlich gerade Material in konzen-

[1]) H. Molisch, Zwei neue Zuckerreaktionen, Sitzgsber. Wien. Akad., 1886, XCIII, 2. Abt., S. 912.

[2]) E. Nickel, Die Farbenreaktionen der Kohlenstoffverbindungen, vgl. ferner A. Reinhold, Über die Molisch-Udranskysche α-Naphthol-Schwefelsäure-Reaktion, Arch. ges. Physiol., 1904, CIII, S. 581.

[3]) G. Kraus, Über das Verhalten des Zuckersaftes der Zellen gegen Alkohol und Glyzerin und die Verbreitung des Zuckers, Bot. Ztg., 1876, XXXIV, S. 603.

triertem Glyzerin oder Weingeist vorliegt. So hat Mac Dougal[1]) durch Einlegen in 70proz. Weingeist Rohrzuckerkörnchen in Isopyrumknollen, besonders zur winterlichen Ruheperiode aufgefunden. Glyzerin war weniger wirksam, Äther und Chloroform erwiesen sich als unbrauchbar. Die ausgeschiedenen Kügelchen waren in lebhafter Molekularbewegung. Einen sicheren Schluß gestattet diese Methode nicht. Einmal gelangen unreine Zuckerlösungen, wie sie in den Pflanzen vorkommen, ungemein schwer in Glyzerin zur Abscheidung, dann ist völlig konzentriertes Glyzerin nicht immer zur Hand, da dasselbe bekanntlich sehr leicht Wasser anzieht (schon beim wiederholten Öffnen des Gefäßes). Spuren von Wasser im Glyzerin vermögen schon größere Quantitäten von Zucker in Lösung zu halten. Außerdem läßt sich eine Diagnose der ausgeschiedenen und von Zuckerarten herrührenden Tröpfchen wohl gegenüber dem Inulin und den Gerbstoffen leicht durchführen, doch bleiben wir ganz im ungewissen über andere in gleicher Form sich ausscheidende Substanzen, deren Natur uns unbekannt ist. Zur Kristallisation, die übrigens wenig beweist, kommt es nur in günstigen Fällen. Nach den makrochemischen Versuchen von Senft[2]) geben gesättigte wässerige Lösungen von Maltose und Laevulose beim Vermischen mit etwas Glyzerin selbst bei nachfolgendem Eindampfen keine Kristalle.

Schließlich sei darauf hingewiesen, daß konzentrierte Schwefelsäure bei Gegenwart von Eiweiß und Zucker Rotfärbung im Gewebe hervorruft. Es würde die Reaktion (Raspailsche[3]) Reaktion) auf Zucker deuten, sowohl auf freie Zuckerarten als auch auf gebundene. Da die gleiche Reaktion aber durch viele Alkaloide u. a. hervorgerufen wird, so berechtigt sie allein zu gar keinem sicheren Schluß.

Auch sei noch bemerkt, daß man zuweilen Zucker mit heißem Paraffin zur Abscheidung bringen kann; die Objekte werden 3 bis 5 Minuten unter Deckglas in Paraffinöl aufgekocht. Der Vorteil der Methode besteht darin, daß sich die Kristalle rein weiß in sehr großen Individuen abscheiden und zwar stets am Deckglasrande. Sie können somit isoliert und mit Phenylhydrazin weiter geprüft werden. In Betracht kommt das Verfahren, wenn braune (tief gefärbte) Pflanzenpulver vorliegen, in denen man die Osazonkristalle nur schlecht erkennen kann. Doch gelingt die Abscheidung nicht immer und als weiterer schwerwiegender Nachteil kommt hinzu, daß die Kristallisation oft mehrere Wochen beansprucht.

Pentosen

Über das Vorkommen freier Pentosen liegen nur wenige Angaben vor. Komatsu u. Sasaoka[4]) stellten aus den Schößlingen von Phyllostachys quilioli

[1]) D. T. Mac Dougal, A contribution to the physiology of the root tubers of Isopyrum biternatum, Minnesota Botan. Studies Bull., 1896, S. 501.

[2]) E. Senft, Der mikrochemische Nachweis des Zuckers, Zeitschr. d. allg. österr. Apoth. Ver., 1904, XLVIII, Nr. 13.

[3]) Raspail, Chim. organique 1839, II, S. 139.

[4]) S. Komatsu u. Y. Sasaoka, Vorkommen freier Pentose in Bambusschößlingen, Bull. chem. soc., Jap., 1927, 2, 57 nach Chem. Centralbl., 1927, I, 2656.

F. M. Xylose dar, die darin in freiem Zustand vorkommen soll. Aus der Tatsache, daß der Pentosegehalt in den Bambusschößlingen während ihres ganzen Daseins konstant ist, schließen sie, daß die Bildung von Pentosen auf den Stoffwechsel der Hexosen zurückzuführen ist.

Nach Colin und Franquet[1]) kann der Gehalt an Pentosen im Gesamtzucker der Blätter der Runkelrübe und der Kartoffel höchstens 0,03 % betragen.

Mikrochemisches ist über den Nachweis von Pentosen in Pflanzen nichts bekannt.

Hexosen

Hexosen nehmen im Leben der Zellen neben den Eiweißstoffen den ersten Platz ein. Sie sind meist die ersten greifbaren Assimilationsprodukte, fehlen wohl keiner pflanzlichen Zelle. Als Hexosen wandern die Kohlehydrate. In größerer Menge finden wir sie in Wurzeln und Früchten, während sie in den reifen Samen gegenüber den anderen Reservestoffen stark zurücktreten und erst wieder bei der Mobilmachung der Reservestoffe gebildet werden. In den Früchten dienen sie als Anlockungsmittel für Vögel zum Verschleppen der Samen, wodurch gleichzeitig die Samen (durch Passieren des Darmkanals) leichter zum Keimen kommen. Der Nektar dient den Insekten zur Nahrung (Pollenübertragung).

Fig. 63. Zuckerkristalle in Glyzerinpräparaten, a) Urginea maritima, b) Phoenix dactylifera (Tunmann)

In die Früchte wird wahrscheinlich Glykose aus den Blättern transportiert und dann später teilweise in Fruktose umgewandelt. Aus Glykose und Fruktose wird dann Saccharose gebildet, so daß in den reifen Früchten der Hauptteil des Zuckers aus Fruktose und Saccharose besteht, A. J. Kokin, Bioch. Zeitschr., 1930, CCXXI, S. 17.

Hexosen und die anderen leicht in Wasser löslichen Mono- und Disaccharide sind in den lebenden Zellen stets in Lösung, scheiden sich auch beim Trocknen der Pflanzen nur relativ selten in kristallinischen Bildungen aus, da unreine Zucker nur schwer kristallisieren. Im Herbarmaterial, in Drogen und im Alkoholmaterial findet man nur selten Zuckerkristalle, die, da sie wasserlöslich sind (Rohrzucker löst sich auch in Alkohol), in Glyzerin- oder Ölpräparaten betrachtet werden (Fig. 63). Bekannt sind Zuckerausscheidungen der Feige (dünne Blättchen), Dattel, des Johannisbrotes, der Rosinen u. a. Nadelförmige Zuckerkristalle (?) finden wir in Bulbus Scillae, den Blättern von Convallaria und zuweilen bei frisch in Weingeist eingelegten Samen von Colchicum autumnale. Besser ausgebildete Kristalle erhält man bei frisch in Glyzerin eingelegten Präparaten (Fig. 63).

Der erste mikrochemische Nachweis der Hexosen (Traubenzucker oder Dextrose, und Fruchtzucker oder Laevulose) und Saccharose rührt

[1]) H. Colin u. B. Franquet, Über sog. freie Pentosen der Blätter, Bull. chim. biol., 1927, IX, S. 114, nach Jahresber. d. Pharmazie, 1927, LXII, S. 9.

von Sachs[1]) her, welcher die von Trommer entdeckte Methode in die mikroskopische Technik einführte; diese benutzt bekanntlich die Fähigkeit der Hexosen, alkalische Metallsalzlösungen in der Hitze zu reduzieren. Nicht zu dünne Schnitte, die wenigstens zwei unversehrte Zellagen enthalten und vorher nicht gewässert sein dürfen (Drogen sind trocken zu schneiden), gelangen auf 1—5 Minuten in eine konzentrierte Kupfersulfatlösung, werden dann rasch mit destilliertem Wasser oberflächlich abgespült und auf einen bereit gehaltenen Objektträger in 1—2 Tropfen siedende Kalilauge (Kaliumhydroxyd und Wasser zu gleichen Teilen) übertragen. Die Dauer der Einwirkung der Kupferlösung richtet sich nach der Dicke der Schnitte und nach der Beschaffenheit der vorhandenen Gewebe (meist genügen 2 Minuten). Zellen, die Dextrose oder Laevulose führen, zeigen bald nach dem Eintragen in die heiße Lauge einen orange- oder rotgelben, feinkörnigen Niederschlag (Gerinnsel) von reduziertem Kupferoxydul. Die rohrzuckerhaltigen Zellen werden zunächst nur durch blaue Färbungen angezeigt. Kocht man nun die Präparate einige Zeit und führt man so den Rohrzucker in Invertzucker (Dextrose und Laevulose) über, dann erscheint von neuem ein mennigeroter Niederschlag von Kupferoxydul.

Wie nun in der Chemie Trommers Reagens von Fehling verbessert wurde und jetzt vorwiegend die Fehlingsche Lösung benutzt wird, so ging man auch in der Mikrochemie zum Gebrauch der Fehlingschen Lösung über bei der die Lauge mit Seignettesalz (saurem weinsaurem Natrium) versetzt ist. Da die fertige Lösung jedoch nur kurze Zeit unzersetzt haltbar ist, so hält man sich die einzelnen Bestandteile derselben in getrennten Lösungen vorrätig und mischt letztere erst beim Gebrauch. Nach Dragendorff[2]) führt man drei getrennte Lösungen, von denen in je 1 Liter die erste 35 g Kupfersulfat, die zweite 173 g Seignettesalz, die dritte 120 g Ätznatron enthält. Nach Schimpers[3]) Vorgange bringt man auf den Objektträger einen großen Tropfen Wasser und je einen kleinen Tropfen der eben genannten Lösungen, mischt die Flüssigkeit mit einem Glasstabe, trägt in die derart frisch bereitete Fehlingsche Lösung die Schnitte ein, bedeckt mit dem Deckgläschen und erhitzt bis zur Blasenbildung. Einfacher hält man sich nach Allihn[4]) nur zwei Lösungen vorrätig. Lösung 1 besteht aus 34,6 g Kupfersulfat in 500 ccm destilliertem Wasser, Lösung 2 enthält in 500 ccm Wasser 173 g Seig-

[1]) J. Sachs, Über einige neue mikrosk.-chem. Reaktionsmethoden, Sitzgsber. d. Münchener Akad., 1859, S. 8; Flora, 1862, S. 289 und Jahrb. f. wiss. Bot., 1864, III, S. 187.

[2]) Dragendorff, Die qualitative und quantitative Analyse von Pflanzenteilen, 1882, S. 70.

[3]) A. F. W. Schimper, Anl. z. mikr. Unt. d. veget. Nahr.- u. Genußm., Jena 1900 und Strasburger, Bot. Prakt., II. Aufl., 1887, S. 73.

[4]) Allihn, Journ. prakt. Chem., XXII, S. 55.

nettesalz und 125 g Kaliumhydroxyd. Diese Lösungen halten sich bei gutem Verschluß und wenn man nicht mit unsauberen Glasstäben hineinkommt, selbst bei häufigem Gebrauch mehrere Jahre. Zur Untersuchung werden gleiche Teile von jeder Lösung auf dem Objektträger vermischt. Übrigens läßt sich die Brauchbarkeit sowohl der nach Dragendorff als nach Allihn erhaltenen Lösungen sehr leicht feststellen. Man hat nur nötig, die Lösung für sich zu erhitzen, wobei sie sich nicht reduzieren darf.

Die Reaktionen mit Fehling haben nun verschiedene Nachteile. Zu diesen zählt der Umstand, daß der durch Hexosen bewirkte Niederschlag von Kupferoxydul nicht streng auf die zuckerhaltigen Zellen lokalisiert ist, sondern als amorphe flockige Masse, besonders bei etwas längerem Erhitzen, sich im ganzen Präparate verteilt. Um diesen Nachteil zu beheben, schlug A. Meyer[1]) nachstehende Methode vor: „Man stellt 2—4 Zellagen dicke Schnitte der zu untersuchenden Pflanzenteile her, legt sie kurze Zeit in eine gesättigte Lösung von Kupfersulfat, schwenkt sie schnell einmal in Wasser ab und bringt sie sofort in eine siedende Lösung von 10 g Seignettesalz und 10 g Ätzkali in 10 g Wasser. Nach einigen Sekunden ist in allen Zellen, welche reduzierenden Zucker enthalten, ein meist kristallinischer Niederschlag von Kupferoxydul entstanden, während die anderen Zellen vollkommen farblos bleiben. Für zartere Freihandschnitte genügt ein Aufenthalt von 2—3 Minuten in der Kupfersulfatlösung. Auch empfiehlt es sich, die Schnitte nach dem Abspülen mit Wasser direkt in den auf dem Objektträger befindlichen Tropfen Alkalilösung zu bringen, das Deckglas aufzulegen und nun bis zur Blasenbildung zu erhitzen.

Ähnliche Ergebnisse liefert die Methode von A. Fischer[2]), der Glykose in Gefäßen nachwies, indem er median gespaltene Holz- oder Stengelstücke auf 5 Minuten in konzentrierte wässerige Kupfersulfatlösung einlegte, mit Wasser abspülte und sie alsdann in einer siedenden Lösung von Seignettesalz-Natronlauge (86,5 g Seignettesalz, 60 g Ätznatron in 100 g Wasser) 2—5 Minuten kochen ließ. Aus den Stücken werden die Präparate hergestellt und am besten in Glyzerin beobachtet. Zu Versuchen kann getrocknetes Holz dienen sowie jedes in größeren Stücken in Weingeist eingelegte Material (hierbei wird Rohrzucker herausgelöst), von dem vor der Reaktion die Schnittflächen entfernt werden müssen. Der Niederschlag bleibt auf die zuckerführenden Elemente gut lokalisiert.

[1]) A. Meyer, Mikrochemische Reaktion zum Nachweis der reduzierenden Zuckerarten, Ber. deutsch. bot. Ges., 1885, III, S. 332.

[2]) A. Fischer, Beiträge zur Physiologie der Holzgewächse, Jahrb. f. wiss. Bot., 1890, XXII, S. 73.

Die Angaben von A. Fischer sind von Linsbauer[1]) mit Recht kritisiert worden. Von einem Nachweis der Lokalisation kann, nachdem man in eine wässerige Lösung legte und mit Wasser abspülte, keine Rede sein.

Die angenommene Anwesenheit der Glykose in den Wasserleitungsbahnen ist unsicher. Der Kupferoxydulniederschlag, der teils im Zelllumen, teils in der Membran selbst zur Abscheidung gelangt, ist ausschließlich oder vorwiegend auf die reduzierende Wirkung der Membran, wahrscheinlich bestimmter Zellulosemodifikationen, zurückzuführen.

Elegante Resultate gibt die Reaktion von Flückiger[2]) mit festem Kupfertartrat, die sich sonderbarerweise in botanischen Kreisen keinen Eingang verschafft hat. Das Kupfertartrat kann man in sehr einfacher Weise selbst herstellen. 30 g Kupfersulfat werden in 300 g heißem Wasser und 70 g Seignettesalz in 200 g heißem Wasser gelöst. Beide Lösungen werden gemischt, der Niederschlag wird gesammelt, getrocknet, und, nachdem er einige Tage im Exsikkator gelegen, in einem kleinen braunen Gefäße aufbewahrt. Das Kupfertartrat ist haltbar, wenigstens besaß ein selbst bereitetes über 3 Jahre altes Präparat noch seine volle Wirksamkeit. Zur Reaktion wird eine kleine Menge auf dem Objektträger in einem Tropfen 15—20proz. Natronlauge gelöst und nach erfolgter Lösung der Schnitt eingetragen und das Präparat mit dem Deckglas bedeckt. Statt der Natronlauge kann man auch ein Körnchen Ätznatron auf dem Objektträger in Wasser auflösen und erst in dieser frisch bereiteten Lauge etwas Kupfertartrat lösen. Das ist aber umständlicher und ohne Vorteil. Die Vorteile der Flückigerschen Methode sind erhebliche. Fruchtzucker (Fruktose) scheidet sofort (ohne Erwärmung!) rotgelbes Kupferoxydul ab, der Niederschlag ist gut lokalisiert. Ein bei nachfolgendem gelindem Erwärmen neu entstehender Niederschlag zeigt Traubenzucker an. Hingegen entsteht kein Niederschlag, falls nur Rohrzucker oder Mannit zugegen ist.

Gegenüber dem Flückigerschen Verfahren bietet die Zuckerreaktion mit angesäuertem Kupferazetat von Barfoed[3]) keine Vorteile. Sie teilt mit der Reaktion von Sachs den Nachteil, daß der Niederschlag nicht auf die zuckerhaltigen Zellen beschränkt bleibt und zeigt keine Saccharose (Rohrzucker) an. 13,3 g neutrales kristallisiertes Kupferazetat wird in 200 g Wasser gelöst und zu 200 ccm dieser Lösung 5 ccm 38 proz. Essigsäure (1,0502 spez. Gew.) zugefügt. Die Reaktion wird in kleinen Porzellanschälchen vorgenommen. Nicht zu dünne

[1]) K. Linsbauer, Bemerkungen über Alfred Fischers Gefäßglykose, Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss. Math. naturw. Kl., Abt. I, 1920, CXXIX, S. 215.

[2]) F. A. Flückiger, Pharmaz. Chem., Pharmakognosie u. auch in Flückiger u. Tschirch, Grundlagen der Pharmakognosie, 1885, S. 237.

[3]) C. Barfoed, Zeitschr. f. analyt. Chem., 1873, XII, S. 27.

Schnitte werden mit etwa 5 ccm kurz aufgekocht. Nach 2—3 Stunden erscheinen die Präparate von ausgeschiedenem Kupferoxydul rot und ein roter Niederschlag findet sich auf dem Boden der Porzellanschälchen. Daß Rohrzucker nicht in Reaktion tritt, läßt sich leicht an Präparaten der Zuckerrüben veranschaulichen.

Kurz hingewiesen sei auf den Nachweis mit weingeistiger Kupferazetatlösung von Lidforss[1]), der durch Anwendung einer weingeistigen Lösung den störenden Einfluß reduzierenden und weingeistlöslichen Nichtzuckers auszuscheiden bestrebt ist. Es werden zwei Lösungen vorrätig gehalten, eine weingeistige Lösung von Kupferazetat mit wenig Essigsäure und Glyzerin versetzt, sowie eine weingeistige Natronlauge. Zur Reaktion mischt man je einen Tropfen der Lösungen auf dem Objektträger, legt die Präparate ein und bedeckt mit dem Deckglase. Nach einiger Zeit entsteht ein auf die zuckerhaltigen Zellen beschränkter Niederschlag.; durch Erwärmen (da eine weingeistige Lösung vorliegt, auf der Asbestplatte oder auf dem Wasserbade) wird die Reaktion beschleunigt. „Was die Empfindlichkeit des Reagens anlangt, so scheint es der Fehlingschen Lösung nicht erheblich nachzustehen und ist dem Barfoedschen Reagens entschieden überlegen."

Für den Nachweis von Fruktose neben Glykose kommt auch das — pflanzenmikrochemisch noch nicht geprüfte — Reagens von Stanley-Benedict in Betracht: Man löst 1,7 g Kuprisulfat, 11,5 g Zitronensäure und 50 g Natriumkarbonat mit Wasser zu 100 ccm. Durch ½-stündiges Erwärmen auf 37—40° tritt Reduktion nur mit Fruktose ein.

Bei der Anwendung der im vorstehenden aufgeführten Verfahren muß stets berücksichtigt werden, daß Reduktionsverfahren niemals spezifische Reaktionen auf Zucker sein können, da insbesondere alkalische Kupferlösungen durch eine große Anzahl von Stoffen (Polyphenole, Gerbstoffe u. a.) reduziert werden.

Zu diesen Nachteilen kommt noch hinzu, daß sich die Niederschläge von Kupferoxydul auf längere Zeit weder in Glyzerin noch in Kanadabalsam halten. Belegobjekte lassen sich also nicht als Dauerpräparate aufbewahren.

Gegenüber dem Nachweis durch Reduktion bietet der Nachweis mit Phenylhydrazin von Senft[2]), den dieser in Anlehnung an die makrochemischen Befunde von Fischer[3]) ausarbeitete, ganz bedeutende Vorteile. Letzterer hat gezeigt, daß reduzierende Zuckerarten mit überschüssigem Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung beim Erwärmen

[1]) B. Lidforss, Über die Wirkungssphäre der Glykose- und Gerbstoffreagentien, Lunds Univ. Årsskr., 1892, XXVIII, Sep.

[2]) E. Senft, Über den mikrochemischen Zuckernachweis durch essigsaures Phenylhydrazin, Sitzgsber. Wiener Akad., CXIII, Abt. 1, Febr. 1904.

[3]) E. Fischer, Synthesen in der Zuckergruppe, Ber. chem. Ges., 1890, XXIII, S. 2114.

kristallinische, gelbe Körper, Osazone, liefern. Schon früher wurde Phenylhydrazin von Lidforss mikrochemisch versucht, aber ohne Erfolg. Benutzt werden mit Senft salzsaures Phenylhydrazin und essigsaures Natron, die in Glyzerin (1 : 10) gelöst, getrennt in braunem Glase aufbewahrt werden. Die Phenylhydrazinlösung wird mit der Zeit tiefbraun, behält aber ihre Wirksamkeit, wenigstens erweisen sich fast 6 Jahr alte, häufig gebrauchte Lösungen noch völlig wirksam. Zum Nachweis wird von jeder Lösung ein Tropfen auf den Objektträger gebracht; die Tropfen werden gemischt, die Präparate eingetragen und das Deckglas aufgelegt. Anwesende Zucker scheiden sich als gelbe Osazone in Gestalt von mehr oder weniger deutlich sphärokristallinischen Kugeln oder von zu Sternen, Büscheln und Garben gruppierten Nadeln

Fig. 64. Osazonkristalle mit Phenylhydrazin, *a*) Strychnos nux vomica (Endosperm), *b*) Vitis vinifera (Fruchtfleisch) (Tunmann)

aus; seltener bilden sich derbe Spieße oder Tafeln (wetzsteinförmig). Zuweilen ist die kristallinische Natur der Ausscheidung kaum zu erkennen, es entstehen Ballen und Klumpen oder kleinkörnige Fällungen (Fig. 64).

Es empfiehlt sich, die Präparate zunächst ohne Anwendung von Wärme einer Dauerbeobachtung zu unterziehen. Zuerst (im Verlaufe einiger Stunden) scheidet sich Fruchtzucker aus, während Traubenzucker erst nach einem oder mehreren Tagen auskristallisiert und Rohrzucker in diesen ohne Wärme hergestellten Präparaten überhaupt nicht gefällt wird. Werden nun Präparate, die bei zweitägigem Liegen bei Zimmertemperatur keine Kristallbildungen aufweisen, auf der Asbestplatte oder auf dem Wasserbade einige Zeit erhitzt (etwa 30—40 Minuten) und erfolgt erst jetzt Kristallbildung, so ist nur Rohrzucker zugegen. Sollten bereits bei Zimmertemperatur Fällungen entstanden sein, dann zeigt sich der Rohrzucker durch Neubildung von Kristallen beim Aufkochen der Präparate an. Wendet man von vornherein Wärme an, so erfolgt die Ausscheidung weit schneller und die Kristalle sind besser ausgebildet. Doch sind hiermit nur Nachteile verbunden, denn die Kristalle treten meist aus den Zellen heraus

und außerdem ist eine Unterscheidung von Frucht-, Trauben- und Rohrzucker nicht mehr möglich.

Senft hatte seine Methode zunächst an Früchten (Ceratonia, Ficus, Pirus, Phoenix, Vitis, Coffea), Blättern (Convallaria, Maranta, Crassula, Canna), Trichomen (Verbascum) und Algen erprobt (Fig. 64). Tichomirow[1]) hat später viele Pflanzen auf Zucker mit diesem Verfahren geprüft und in allen untersuchten Fällen Zucker nachweisen können. Negative Resultate erhielt er nur bei Lemna trisulca und Atropa belladonna (Begründung s. S. 279, Anmerk. 2). — Das Senftsche Verfahren hat schließlich den Vorteil, daß sich die Präparate in Glyzerin-Gelatine als Dauerpräparate aufheben lassen. —

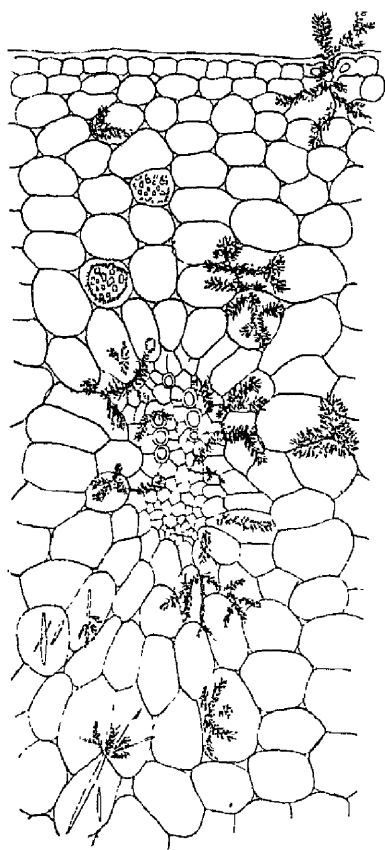



Fig. 65. Urginea maritima. Fruktosenachweis mit Methylphenylhydrazin (10 Minuten erwärmt) (Tunmann)

Grafe[2]) führte das sekundäre asymmetrische Methylphenylhydrazin ein, welches unter bestimmten Bedingungen nur mit Ketosen, nicht mit Aldosen ein Methylphenylosazon bildet[3]). Da aber Sorbose nur ein sirupartiges Osazon liefert, so ist Methylphenylhydrazin ein spezifisches Reagens auf Fruktose, allerdings nur bei einem Mindestgehalt von 0,08 %[4]). Es entstehen in kalt behandelten Präparaten gewöhnlich erst in 2—4 Tagen Ausscheidungen von Fruktosemethylphenylosazon (gelbe bis braune Garben, Sphärite und Schollen, die aus heißem Weingeist umkristallisiert werden können). Die Kristallbildung erfolgt schneller bei mehrstündigem Erwärmen auf 40° oder bei bis 10 Minuten langem Erhitzen auf dem Wasserbade (Fig. 65). Beim Einhalten dieser Temperaturen wird Rohrzucker nicht invertiert. In Verbindung mit dem Senftschen Verfahren läßt sich nun einwandfrei Glykose, Fruktose und Saccharose nachweisen.

[1]) W. Tichomirow, Sur la valeur de la réact. micro-chimique de la Phénylhydrazine, Ann. du Jard. de Buitenzorg, Leide, 1910, Suppl. III, S. 537.

[2]) V. Grafe, Studien über den mikrochemischen Nachweis verschiedener Zuckerarten in den Pflanzengeweben mittels der Phenylhydrazinprobe, Sitzgsber. Wien. Akad., 1905, CXIV, Abt. 1, S. 15.

[3]) C. Neuberg, Ber. D. chem. Ges., 1902, XXXV, S. 959.

[4]) Das Methylphenylhydrazin muß völlig frei von Phenylhydrazin sein.

Bei allen Vorzügen erfordert die Phenylhydrazin-Reaktion immerhin eine kritische Beurteilung, andernfalls Irrtümer nicht ausgeschlossen sind. Da bei der Reaktion Glyzerinlösungen benutzt werden, so scheiden sich außer den Osazonen alle jene Stoffe mit aus, die in Glyzerin allein zur Ausscheidung gelangen (Hesperidin, Inulin u. a.). Auch die gelbe Farbe der Kristalle und ihre Formen sind mit Vorsicht zu bewerten, da bekanntlich die sich ausscheidenden Substanzen Farbstoffe aus dem Gewebe und der Reagenzlösung mitreißen und so, zumal wenn sie nicht ganz rein sind, gefärbt erscheinen. Es müssen somit alle bei der Phenylhydrazin-Reaktion erhaltenen Ausscheidungen in jedem einzelnen Falle genau als Osazone identifiziert werden, was bei kleinkörnigen Niederschlägen nicht immer ganz leicht ist. Nach Tichomirow sind die Osazone unlöslich in Wasser, Glyzerin, Säuren, löslich in Weingeist, schwer löslich in Chloralhydrat: sie widerstehen Alkalien und Senft benutzt 30proz. Kalilauge und 60proz. Chloralhydratlösung zum nachträglichen Aufhellen der Präparate; er bemerkt auch, daß die Osazone erst bei längerer Einwirkung von kaltem Weingeist gelöst werden.

An dieser Stelle sei auf das zur Untersuchung zu benutzende Material eingegangen, auf dessen Beschaffenheit man sonderbarerweise in sehr vielen Fällen wenig Gewicht gelegt hat. Handelt es sich darum, lediglich „Zucker" nachzuweisen, so läßt sich sowohl frisches als auch getrocknetes, oft auch in Weingeist eingelegtes Material benutzen. Nun wollen wir aber mit unseren Methoden die nativ in den Zellen auftretenden Zucker (Trauben-, Frucht-, Rohrzucker) nachweisen und nicht glykosidisch gebundenen Zucker. Die zahlreichen Arbeiten der Chemiker[1]) haben erwiesen, daß beim Trocknen der Pflanzen allenthalben enzymatische Spaltungen der Glykoside eintreten und auch beim schnellen Trocknen, wie es bei Herbarmaterial geschieht, nicht ausgeschlossen sind. Sogar bei Verwendung von Weingeistmaterial ist Vorsicht geboten. Werden doch in 60—70proz. Weingeist keineswegs alle Fermente abgetötet, so daß Glykoside sich in derart aufbewahrtem Material zersetzen können, wie Bridel[2]) beim Gentiopikrin der Wurzel von Gentiana lutea nachwies. Auf die Konzentration des zum Konservieren benutzten Weingeistes wird meist wenig geachtet. Zum einwandfreien Nachweis von Frucht-, Trauben- und Rohrzucker muß somit bei jeder Methode lebendes Material benutzt werden. Enzymatische Spaltungen können übrigens beim Einlegen der Präparate in Phenylhydrazin auf ein bis zwei Monate, wie es Tichomirow machte, ebenfalls eintreten, selbst bei Benutzung lebenden Materials.

Die Selbstdarstellung ist umständlich. Eine Vorschrift gibt Grafe (l. c. S. 18). Das Reagens wird 1 : 10 in Glyzerin gelöst und zwar kalt unter Umschütteln. Die Lösung wird bald dunkelrot, darf aber nur schwachen Geruch zeigen und wird wie das Senftsche Reagens mit Natriumazetat benutzt.

[1]) Vornehmlich Bourquelot im Journ. d. Pharm. et d. Chim.

[2]) M. Bridel, Journ. de Pharm. et de Chim., 1911, 7, III, S. 534.

Den Zucker der Nektarien weist Knuth[1]) teils mit Fehlingscher Lösung nach, teils wendet er als Reagens Ortho-Nitrophenol-Propiolsäure an, welche Hoppe-Seyler empfohlen hatte und die bei Gegenwart von Traubenzucker eine Indigoblau-Fällung liefert. Die ganzen Blüten werden 24 Stunden in Fehling oder in einer alkalischen Orthonitrophenolpropiolsäure mazeriert, dann darin aufgekocht, in kaltem Wasser ausgewaschen und untersucht.

Rohrzucker (Saccharose)

Im Pflanzenreich in kleinen und größeren Mengen weit verbreitet.

Der Rohrzucker bildet monokline Kristalle und soll in zwei Modifikationen auftreten, von denen die eine bei 185°, die andere bei 169—170° schmilzt. Leicht löslich in Wasser, in 100 Teilen 90proz. Weingeist, nicht in Äther und Petroläther. Wird durch Säuren oder Invertase in Glykose und Fruktose gespalten. Bildet schwerlösliche Verbindungen mit Erdalkalien und Blei.

Wo Rohrzucker in größerer Menge auftritt, kommt ihm der Charakter eines Reservestoffes zu. Als solcher tritt er in vielen Wurzeln (Umbelliferen) und in Stengeln (Palmen, Saccharum) auf. Durch Kultur und Zuchtwahl hat man den Rohrzuckergehalt von Beta vulgaris von 8 bis auf 20% erhöht. Der Saft der Stengel von Saccharum officinarum führt bis zu 20%, der von Acer saccharum noch mehr Rohrzucker und im Stengel von Zea mays läßt er sich durch Entfernen der unreifen Kolben bis auf 12—14% der frischen Stengel anreichern. In den Nektarien vieler Blüten ist ebenfalls Rohrzucker zugegen. In einigen Blüten finden sich sogar größere Mengen, so enthalten die Blüten von Sesbania grandiflora Poir. nach Boorsma 8% der Trockensubstanz an Rohrzucker (neben 44,3% Invertzucker; Teysmannia 1910). Auch in Samen, so im Zuckermais, können nicht unbeträchtliche Mengen Rohrzucker vorkommen.

Der Gang der Zuckerbildung und -umwandlung ist beim Zuckerrohr sehr regelmäßig. Organe, die kein Wachstum mehr zeigen, speichern Saccharose, im Wachstum begriffene Gewebe führen Glykose und Fruktose (Went, Chem.-phys. Unters. üb. d. Zuckerrohr, Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXI, S. 325).

Der Wurzel von Beta vulgaris wird nicht Rohrzucker, sondern Invertzucker zugeführt; in der zweiten Vegetationsperiode wandert der Zucker innerhalb der Wurzel als Rohrzucker und wird beim Eintritt in die Blätter gespalten (Ruhland, Jahrbücher für wiss. Bot., 1911, L, S. 200).

Bei der Keimung der Erbse wird der in den ungekeimten Erbsen vorhandene Rohrzucker teilweise verbraucht, teils für Wachstum, teils für Respiration. Im zweiten Keimlingsstadium ist der in den Kotyledonen vorhandene Rohrzucker als Wanderform der Stärke zu betrachten (P. Boysen-Jensen, Jahrbücher f. wiss. Bot., 1915, LVI, S. 431).

[1]) P. Knuth, Nachweis von Nektarien auf chemischem Wege, Bot. Zentralbl., 1898, LXXVI, S. 76.

Es war oben schon gesagt (S. 293), daß wir mit den Methoden von Sachs und A. Meyer Glykose neben Saccharose nachweisen können. Bei kurzem Aufkochen entstehende Niederschläge werden durch Monosaccharide hervorgerufen, während rohrzuckerhaltige Zellen zunächst nur eine intensiv blaue Färbung annehmen und erst bei längerem Kochen (wobei Rohrzucker invertiert wird) Niederschläge geben. Da aber bei dem längeren Kochen vielleicht auch aus dem einen oder anderen Glykosid Zucker abgespalten wird und sich die Glykoside vor der Reaktion schwer entfernen lassen, so ist es vorteilhafter zum Nachweis von Glykose und Rohrzucker, die Verfahren von Czapek[1]) und Hoffmeister[2]) anzuwenden. Hierbei wird der Rohrzucker durch Hefeinvertin invertiert. Das Hefeinvertin wird gewonnen, indem man frische, rasch getrocknete Hefe mit Wasser zu einem dicken Brei anrührt, den Brei 12 Stunden bei 40^0 stehen läßt und dann abpreßt. Das Extrakt wird filtriert und mit Weingeist gefällt. „Der Niederschlag ist ein gelblichweißes in Wasser lösliches Pulver.“ Dieses derart gewonnene Invertin wird in konzentrierter wässeriger Lösung benutzt. Diese Invertinlösung zeigt nur kurze Zeit eine zuverlässige Wirkung. Es werden nun Vergleichspräparate, Schnitte aus frischem Material von 3—4 Zelllagen Dicke, in Untersuchung genommen. Ein Teil der Schnitte wird direkt nach A. Meyer behandelt. Ein anderer Teil der Präparate kommt auf dem Objektträger auf wenigstens 3 Stunden in einen Tropfen Hefeinvertinlösung; ist der Tropfen eingedunstet, so wird von neuem befeuchtet; alsdann werden die Schnitte nach kurzem Abspülen mit Wasser in gleicher Weise untersucht. Ist Rohrzucker zugegen, so werden natürlich die Präparate, die in der Invertinlösung lagen, weit stärkere Reaktionen geben, als die anderen, die nur Traubenzucker enthielten oder gar frei davon waren.

Nun ist zu beachten, daß wohl die Inversion des Rohrzuckers in 3 Stunden meist beendet ist, daß jedoch die Invertinlösung durch starke Membranen sehr schlecht diffundiert. In starkwandige Zellen (Samenendospermen) war die Invertinlösung oft nach 12 Stunden noch nicht genügend eingedrungen. Hoffmeister hält eine dreistündige Einwirkung für ausreichend, doch hat er überwiegend zartwandige Objekte untersucht (starke Wände haben von dem geprüften frischen Material die Samen von Cocos nucifera und von dem getrockneten die Samen von Coffea arabica und Castanea vesca). Tunmanns Be-

[1]) F. Czapek, Über die Leitungswege der organischen Baustoffe im Pflanzenkörper, Sitzgsber. Wiener Akad., 1897, CVI, 1, Sep., S. 14.

[2]) C. Hoffmeister, Über den mikrochemischen Nachweis von Rohrzucker in pflanzlichen Geweben, Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXI, S. 688.

funde stimmten überein mit den Erfahrungen von Grüss[1]), nach dem Invertinlösung in mit dichtem Plasma erfüllte Zellen gleichfalls schwer eindringt. Es bleibe dahingestellt, ob das Eindringen durch starke Zellmembranen oder durch dichtes Plasma erschwert wird, jedenfalls wird man in Fällen, in denen bei dreistündiger Einwirkung noch kein Rohrzucker nachweisbar ist, zur Sicherheit einige Präparate 12, sogar 24 Stunden in größeren Mengen Invertinlösung belassen, der man als Antiseptikum eine Spur Thymol zusetzen kann. Bei der Anwendung von Invertin ist zu beachten, daß es auch noch andere Stoffe (Raffinose, Gentianose) gibt, die durch Invertin unter Bildung reduzierender Zucker gespalten werden.

In Präparaten, die neben Rohrzucker große Mengen Traubenzucker enthalten, muß letzterer erst entfernt werden. „Die Schnitte werden direkt in Schälchen mit konzentrierter, siedend-heißer Kupfersulfat-Seignettesalz-Natronlauge gebracht, so daß das Oxydationsmittel möglichst rasch und in großem Überschuß einwirken kann. Nach 1—2 Minuten ist die Glykose quantitativ oxydiert“ (Hoffmeister). Das gebildete Kupferoxydul läßt sich beseitigen, indem die Schnitte nach dem Abspülen mit sehr schwacher Weinsäurelösung in eine konzentrierte erwärmte Magnesiumchloridlösung gebracht werden. Sie werden dann nochmals mit Weinsäurelösung abgespült und dürfen jetzt bei kurzem Aufkochen in Fehlingscher Lösung keine Glykose mehr anzeigen. Werden diese Präparate nun mit Invertinlösung und nachfolgend mit Fehling behandelt, so zeigt ein Niederschlag Rohrzucker an[2]). Mit der Invertinmethode läßt sich, wie Kontrollversuche mit Helianthus-Mark, das mit Rohrzuckerlösung injiziert war, ergaben, noch 0,01 % Rohrzucker nachweisen, sowie 0,5 % Rohrzucker neben 1—5 % Traubenzucker.

Inulin

Inulin wurde 1804 von Valentin Rose in Inula helenium entdeckt und von Thomson benannt. Nach Schlubach und Elsner ist Inulin ein Sammelname für ein wechselndes Gemisch hochmolekularer Polylävane, in denen ein Glykoserest eingebettet ist.

Löslich in 125 Teilen kaltem Wasser, leicht in heißem, scheidet sich aber dann nur schwierig wieder aus. Unlöslich in Glyzerin und Weingeist. Die wässerige Lösung färbt sich mit Jod gelb. Ist mit Brombromwasserstoffsäure, Tannin, Silikowolframsäure und Phosphormolybdänsäure auch bei Gegenwart von Salzsäure — im Gegensatz zu vielen anderen höheren Kohlenhydraten — nicht fällbar.

[1]) J. Grüss, Über den Umsatz der Kohlehydrate bei der Keimung der Dattel, Ber. deutsch. bot. Ges., 1902, XX, S. 42.

[2]) Vgl. dazu S. 295 oben.

Hydrolyse führt zu einem Gemisch von viel Fruktose und ein wenig Glykose.

Inulin entsteht — in der Zichorie — in den Blättern während der Kohlensäureassimilation bis zu 3 und 4%. Die Wurzel reichert sich mit fortschreitender Entwicklung an. Das im Zellsaft gelöste Inulin bedeutet für die Wurzel einen „thermisch-aktiven" Kälteschutz. Der Samen der Zichorie enthält Inulin neben Fett; bei der Keimung entsteht aus letzterem Inulin (Grafe und Vouk)[1].

Das Inulin der Blätter von Cichorium intybus und der von Melchior untersuchten Marcgravia-Arten ist ein unmittelbares Assimilationsprodukt, wird also nicht über Stärke gebildet.

Inulin fehlt in den Blättern des Topinamburs. Die vom Blattstiel kommenden Zucker wandern durch die Rinde und dringen in den Markstrahlen in den Zentralzylinder bis in das Mark. Was nicht an Ort und Stelle verbraucht wird, wandert nach abwärts und wird unterwegs in Inulin verwandelt; es nimmt deswegen im Stengel von oben nach unten zu. Im Laufe des Winters wandelt sich ein Teil des Inulins in Saccharose und Lävulosane von niedrigerem Drehungsvermögen um[2].

Inulin ist in der lebenden Zelle im Zellsaft gelöst, es vermag also direkt zu wandern. Es findet sich namentlich in Compositen und in den diesen nahestehenden Familien, Campanulaceen, Lobeliaceen, Goodeniaceen, Stylidiaceen, ferner in Violaceen (Jonidium ipecacuanha, bei der Bestimmung falscher Ipecacuanha diagnostisch wichtig) und in einigen Monokotylen (Leucojum, Galanthus, Allium, Hyacinthus, Narcissus). Das Inulin verschiedener Kleinia-Arten wurde von Kahns[3]) studiert. Nägeli[4]) und Cramer[5]) gaben Inulin im Zellsafte einiger Algen an (Botryophora occidentalis, Acetabularia, Polyphysa), was noch nachzuprüfen wäre. Es vertritt vollkommen die Stärke, häuft sich ebenso wie diese in den unterirdischen Reservestoffbehältern im Herbste an, um im Frühling verbraucht zu werden. So fand sich in Rad. taraxaci[6]) im Herbst 24%, im März 1,74%, in Rad. pyrethri im Herbst 57,7%, im Frühling 19% Inulin. Demgemäß schwankt der Gehalt in Drogen je nach der Zeit der Einsammlung. Rundquist[7]) gibt folgenden Prozentgehalt an: Rad. artemisiae 9,66, Rad. bardanae 46,25, Rad. carlinae 17,87, Rad. cichorii 18,50, Rad. farfarae 17,40, Rad. helenii 35,10, Rad.

[1]) V. Grafe und V. Vouk, Untersuchungen über den Inulinstoffwechsel bei Cichorium Intybus L. (Zichorie), Biochem. Zeitschr. 1913, LVI, S. 249.

[2]) H. Colin, Formation, distribution et circulation de l'inuline dans la tige de Topinambour, Compt. rend. Acad. sciences Paris 1924, CLXXIX, S. 1186.

H. Colin, Transformations de l'inuline dans le tubercule de Topinambour pendant la période de repos. Compt. rend. Acad. sciences 1918, CLXVI, S. 305.

[3]) H. Kahns, Zur Kenntnis der physiologischen Anatomie der Gattung Kleinia, Kieler Dissertation, 1909.

[4]) C. Nägeli, Sitzgsbr. bayr. Akad., 1862.

[5]) C. Cramer, Denkschr. Schweiz. nat. Ges., 1887, XXX, S. 16.

[6]) Dragendorff, Materialien zu einer Monographie des Inulins. Petersburg, 1870.

[7]) C. Rundquist, Farmac. Notisblad, 1904.

pyrethri germ. 26,19, Rad. pyrethri roman. 35,66, Rad. scorzonerae 31,64, Rad. taraxaci 39,65, Rhiz. arnicae 5,55. Zur Blütezeit schwindet Inulin fast ganz.

Der Inulinertrag von Dahlien kann durch Entfernen der Blütenknospen gesteigert werden, da dann mehr der inulinhaltigen Knollen gebildet werden (Pirschle).

Auch in den oberirdischen Teilen dieser Pflanzen trifft man Inulin an, so in Blättern (Tussilago farfara[1])), Cichorium Intybus, Marcgravia-Arten[2]) („Inulinblätter"), in Blütenköpfchen (Cynara scolymus). Doch führen Chlorophyllkörner, Schließzellen der Spalten, Siebröhren und Stärkescheiden nach Kraus stets Stärke. Nach Behrens und G. Meyer[3]) soll Inulin im Topinamburstengel in den Gefäßen vorkommen und in diesen zu den Knollen herabwandern. Nach Colin[4]) bildet sich das Inulin im Holzzylinder und Mark des Topinamburstengels. Die Ansicht de Candolles, nach der Helianthus tuberosus in den Tropen statt Inulin Stärke bilden soll, trifft nach Kraus[5]) wenigstens bei in Java kultivierten Pflanzen nicht zu.

In den lebenden Zellen ist Inulin nicht wahrnehmbar, da es im Zellsaft gelöst ist. Ist es aber in sehr beträchtlichen Mengen zugegen, wie in den Kompositenwurzeln des Herbstes, und bringt man ein derartiges Präparat lebenden Materials unter Deckglas in einen Tropfen Wasser, dann bemerkt man größere oder kleinere, fast farblose, glänzende Tröpfchen in den Zellen auftreten, die oft ineinanderfließen und sich vergrößern, bei Zusatz von neuen Wassertropfen aber wieder verschwinden. Diese Tropfen sind nach Tunmann ausgeschiedenes Inulin. Inulin ist in Weingeist (selbst in 65proz.) und in Glyzerin unlöslich; es gelangt daher bei Einwirkung dieser Reagentien zur Ausscheidung, sowohl beim Einlegen von Präparaten unter Deckglas als auch beim Eintragen größerer oder kleinerer Pflanzenstücke in diese Flüssigkeiten. Auch beim Trocknen der Pflanzen (bei Wasserentzug, also ebenfalls beim Gefrieren) scheidet es sich aus, so daß wir es in Herbarmaterial und in den Drogen antreffen.

Legt man Präparate frischen Materials unter Deckglas in absoluten Alkohol, dann scheidet sich zuweilen das Inulin in Form eines feinen kristallinischen Mehles ab. Bringt man Pflanzenteile auf eine Woche und länger in 65—70proz. Weingeist oder in Glyzerin und stellt aus

[1]) W. Mitlacher, Pharm. Post, 1902, XXXV, S. 377.

[2]) H. Melchior, Über das Vorkommen von Inulin in den Blättern der Marcgraviaceen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1924, XLII, S. 198. Der mikrochemische Nachweis des Inulins ist bei Melchior ungenügend; Löslichkeitsverhältnisse und negatives Verhalten gegen Jodjodkalium genügen dafür nicht.

[3]) G. Meyer, Über Inhalt und Wachstum der Topinamburknollen, Ber. D. bot. Ges., 1895, XIII, S. 184.

[4]) H. Colin, Rev. gén. Bot., 1925, XXXVII, S. 97.

[5]) G. Kraus, Botanische Notizen, Zeitschr. f. Bot., 1909, I, S. 526.

diesem Material Präparate her, so finden wir das Inulin in gut ausgebildeten, den Zellwänden oft anliegenden kugeligen Sphärokristallen. Hierbei gelangt es auch an sekundäre Lagerstätten (in die Gefäße), wie es schon Prantl angibt; die Ansicht von G. Meyer[1]), nach dem Inulin hauptsächlich in den Gefäßen wandern soll, erscheint zweifelhaft. Wenigstens zeigten frische Längsschnitte von Helianthus tuberosus nur im Parenchym Inulin. Molisch fand es auch in Milchsäften. Sollten die Sphärokristalle nicht gut ausgebildet sein, dann läßt sich ein besserer Einblick durch kurze Behandlung mit weingeistiger Chloralhydratlösung gewinnen. Die Sphärokristalle lassen nun einen deutlich strahlig radialen Bau und eine konzentrische Schichtung erkennen. Trichite (feine, das Licht doppeltbrechende Kristallnadeln) sind radial in konzentrischen Schichten angeordnet (Fig. 66a, b). Sie zeigen das schwarze Kreuz im polarisierten Licht und bei Einschaltung des Gipsplättchens Rot I die gleichen Additions- und Subtraktionsfarben wie die Stärkekörner. In Drogen lassen die Sphärokristalle ihren Bau oft undeutlich hervortreten. Es rührt dieses daher, daß sich an und in dem Inulinkristall andere amorphe und in Glyzerin und in Weingeist nicht leicht lösliche Polysaccharide abgeschieden haben, welche die Trichite gewissermaßen verkitten. Diese „amorphen“ Polysaccharide[2]), die das Inulin in den Zellen begleiten (s. unten), lösen sich eben bei Zusatz von Choralhydratlösung oder von verdünnter Salpetersäure zuerst auf, so daß der strahlig radiale Aufbau schärfer hervortritt. Auch bei längerem Verweilen der Präparate in wenig

Fig. 66. Inulinausscheidungen, *a*) Inula helenium (Wurzeldroge), Schnitt einige Zeit in Wasser, radiale Schichtung deutlich, konzentrische selten; *b*) Dahlia variabilis (Knolle, Alkoholmaterial), radiale und konzentrische Schichtung gut sichtbar; *c*) Lappa spec. (Wurzel), Schnitt kurze Zeit in Chloralhydrat-Glyzerin, konzentrische Schichtung fehlt (Tunmann)

[1]) G. Meyer, Beiträge zur Kenntnis des Topinamburs, Ber. d. bot. Ges., 1896, XIV, S. 347.

[2]) Die genaue Natur dieser Polysaccharide ist noch unbekannt. Auch Laevulose läßt sich in Inulinzellen meist nachweisen, wenigstens fand Tunmann mit Phenylhydrazin Laevulose in Rad. bardanae, — enulae, — pyrethri, — cichorii, — taraxaci. Beachtenswert ist ferner das gleichzeitige Vorkommen von Kalziumphosphat.

Wasser erscheinen die Kristalle schärfer. Nach H. Fischer[1]) sind die Sphärite in Wasser quellbar, schmelzen aber beim Erwärmen in Wasser wie langsam lösliche Kristalle ab.

In Drogen und in Herbarmaterial findet man die Zellen oft ganz mit großen Klumpen gefüllt (besonders bei Wurzeln aus dem Herbst), die eine Vorstellung von den großen Quantitäten von Inulin geben, die die lebende Zelle in Lösung zu halten vermag. Die Lösung dieser großen Quantitäten in der lebenden Zelle muß durch andere Stoffe bedingt werden, nach Tunmann[2]) durch andere Polysaccharide oder durch phosphorsauren Kalk (?). Hartwich[3]) hat in der Tat schon 1904 gefunden, daß in vitro Zusatz einer Spur Pflanzenschleim zur Herstellung einer sehr stark übersättigten Inulinlösung genügt. Überwiegend bezeichnet die Literatur die glasigen Klumpen, die scharfe Kanten und einen muschligen Bruch zeigen und beim Präparieren aus den angeschnittenen Zellen oft herausfallen, als amorph. Eingehende Betrachtungen zeigen indessen, daß auch in den Klumpen das Inulin in feinen Kristallen auftritt. Hiervon kann man sich teils ohne weiteres an geeigneten Stücken überzeugen, teils bei Zusatz von Chloralhydratlösung. Es scheint, daß bei dem langsamen Wasserentzug die anderen bereits erwähnten Polysaccharide sich inniger dem auskristallisierenden Inulin anfügen und derart die kristallinische Struktur der Klumpen verdecken. —

Inulin in größerer Menge ist in reinem kaltem Wasser (unter Deckglas) nur schwer löslich. Bei jahrelangem Aufbewahren der Präparate oder der Pflanzenteile in Weingeist wird die Löslichkeit in Wasser herabgesetzt[4]). Stets löst es sich aber beim Erwärmen in Wasser und in Glyzerin, ferner in Essigsäure, Ammoniak, Kupferoxydammoniak, Kalilauge und Mineralsäuren, und zwar in den letzten beiden Reagentien (im Gegensatz zum Hesperidin) ohne Farbenerscheinung. Jodreagentien färben nicht oder doch nur wenig hellgelb. Chlorzinkjod löst farblos. Wasserlösliche Farbstoffe färben die Ausscheidungen schwach, die Farbstoffe werden aber nicht gespeichert[5]). Sie verhalten sich in dieser

[1]) H. Fischer, Über Inulin, sein Verhalten innerhalb und außerhalb der Pflanze, Cohns Beitr., 1898, VIII, S. 53.

[2]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie des Inulins, Ber. d. pharm. Ges., 1910, XX, S. 577.

[3]) C. Hartwich, Beitrag zur Kenntnis der Ipecacuanhawurzeln, Arch. d. Pharm., 1904, CCXLII, S. 669.

[4]) H. Leitgeb, Über die durch Alkohol in Dahliaknollen hervorgerufenen Ausscheidungen, Bot. Ztg., 1887, XLV, S. 129.

[5]) H. Fischer, Stärke und Inulin, Beih. z. bot. Zentralbl., 1902, XII, S. 226.

Hinsicht wie die Stärkekörner. Zur Diagnose fand Tunmann die Färbungen nicht verwertbar. Am besten färben stark verdünnte wässerige Lösungen von Fuchsin, Safranin, Chrysoidin, Malachitgrün, Methylgrün, Jodgrün, Gentianaviolett (H. Fischer[1])).

Anlaß zur Verwechslung können bei optischer Betrachtung Kalziumphosphat, Hesperidin und harziges Sekret geben. Letzteres wird aus den schizogenen Gängen (Compositenwurzeln) bei der Präparation durch das Messer auf und in Parenchymzellen übertragen und sieht bisweilen in Gestalt dem Inulin ähnlich. Diese Sekretmassen lösen sich jedoch zum größten Teil in Weingeist, färben sich ferner mit Jodjodkalium und Chlorzinkjod meist dunkelbraunrot. Kalziumsphärite (bei Weingeistmaterial) lösen sich langsam in Wasser unter Deckglas (Durchsaugen von Wasser) und Zusatz von Schwefelsäure bewirkt braungelbe Färbung, dann Bildung von Kalziumsulfatkristallen. In vegetativen Teilen der Kompositen und Lobeliaceen können schließlich Verwechselungen mit Hesperidin unterlaufen. Hesperidinausscheidungen sind aber in heißem Wasser unlöslich und werden von Alkalien mit gelber Farbe gelöst.

Zum Nachweis von Inulin wendet man schließlich einige Reaktionen an, die auf Bildung von Oxymethylfurfurol beruhen. Nach Molisch[2]) betupft man nicht zu dünne Schnitte auf dem Objektträger mit einem Tropfen einer 15—20proz. weingeistigen α-Naphthollösung, fügt dann vom Deckglasrande 2—3 Tropfen Schwefelsäure zu und erwärmt eventuell gelinde. Inulin löst sich mit violetter Farbe. Benutzt man eine 15—20proz. weingeistige Thymollösung, dann entsteht eine karminrote Färbung (vgl. dazu S. 290). Green[3]) befeuchtet die Präparate mit einer weingeistigen Lösung von Orcin, legt das Deckglas auf, fügt konzentrierte Salzsäure zu und erhitzt. Hierbei löst sich Inulin mit orangeroter Farbe. Die Reaktion wurde von Meyer und Behrens für gut befunden. Wendet man eine weingeistige Phloroglucinlösung an, so tritt braunrote Lösung ein. Doch sei darauf hingewiesen, daß Paragalaktane (Endosperm von Lupinus) bei dieser Reaktion ebenfalls rötliche Farbenreaktionen geben. In gleicher Weise gibt Hydrochinonsalzsäure mit Inulin eine braune Färbung.

Da bei diesen Verfahren die Säuren in konzentrierter Form herangezogen werden, die teils das Gewebe sofort zerstören (Schwefelsäure),

---

[1]) H. Fischer, Mikrophotogr. von Inulinsphäriten und Stärkekörnern, Ber. deutsch. bot. Ges., 1903, XXI, S. 107.

[2]) H. Molisch, Zwei neue Zuckerreaktionen, Sitzgsber. Wiener Akad., 1886, XCIII, Abt. II, S. 912.

[3]) J. R. Green, On the germination of the tuber of the Jerusalem Artichoke (Helianthus tuberosus), Annals of Botany, 1889, I, S. 223.

teils zu stark und zu schnell hydrolysieren, so empfiehlt Tunmann (l. c.) folgende Methode: Die Schnitte müssen einer Vorbehandlung unterworfen werden, bestehend in einer achttägigen Mazeration in Weinsäure-Weingeist (zur Entfernung der Alkaloide), und in einer möglichst langen (8—10 Wochen) Mazeration in Weingeist (zur Härtung des Inulins). Sie vertragen nun ein genügend langes Auswaschen mit Wasser zur Entfernung von Zucker und Pflanzensäuren (Weinsäure)[1]) und werden jetzt mit Pyrogallol- oder Resorcinsalzsäure (0,1 in 5,0 Weingeist und 5,0 konzentrierter Salzsäure) behandelt; erstere färbt bei kurzem gelinden Erwärmen violettrot, letztere zinnoberrot. Membransubstanzen, ebenso Stärke, treten beim gelinden Erwärmen in der verdünnten Säure des Reagens nicht mit in Reaktion.

Eine Anzahl dem Inulin nahestehender Polysaccharide sind in chemischer Hinsicht noch recht mangelhaft untersucht, die Ergebnisse zeigen noch wenig Übereinstimmung. Mikrochemisch sind diese Körper nicht erforscht. Zu dieser Gruppe zählen u. a. folgende Substanzen: Die von Tanret[2]) aus Topinamburknollen durch fraktionierte Fällung mit Baryumhydroxyd isolierten Körper, Pseudinulin (Körner), Inulenin (mikroskopische Nadeln), Helianthenin (mikroskopische Sphärite), Synanthrin (amorph). In Liliaceen kommt das von Schmiedeberg[3]) entdeckte Sinistrin vor, das mit dem Scillin von Riche und Rémont[4]) identisch sein soll und, wie A. Meyer[5]) fand, in den Liliaceen allgemein verbreitet ist und in den Blättern die Stärke vertritt. Diesem nahe verwandt oder gar identisch ist das Irisin, das Wallach[6]) im Rhizom von Iris pseudacorus, Blezinger[7]) in Iris sibirica fand. Hierher gehört ferner das Triticin des Rhizoma Graminis, welches H. Müller[8]) zuerst darstellte und beschrieb. Nach H. Keller[9]) sollen Irisin und Triticin identisch sein. Aus der Zwiebel von Allium scorodoprasum L. erhielt Kihara[10]) die Scorodose $(C_6H_{10}O_5)_4$. In Kryptogamen und zwar in Cyano-

[1]) Weinsäure und weinsaure Salze werden mit Resorcin-Schwefelsäure violettrot, aber nur beim Aufkochen und nicht bei Gegenwart von Nitraten. Laevulose wird mit Resorcinsalzsäure eosinrot; sie wird an mit Alkohol gehärteten Schnitten durch Wässern leicht entfernt, wie die Kontrolle mit Phenylhydrazin zeigt.

[2]) C. Tanret, Compt. rend., 1893, CXVII, S. 212.

[3]) O. Schmiedeberg, Zeitschr. physiol. Chem., 1879, III, S. 112.

[4]) A. Riche und A. Rémont, Journ. pharm. chim., 1880, II, S. 291.

[5]) A. Meyer, Bot. Ztg., 1885, XLIII, S. 490.

[6]) O. Wallach, Ber. d. chem. Ges., 1888, XXI, S. 396.

[7]) Th. Blezinger, Bot. Zentrbl., 1892, LIX, S. 279.

[8]) H. Müller, Arch. d. Pharm., 1872, CCX, S. 132 und Journ. f. prakt. Chem., 1873, S. 832.

[9]) H. Keller, Über die Kohlenhydrate der Monokotylen, insbesondere Irisin, Sinistrin, Triticin, Münster 1894 und A. Meyer, Wiss. Drogenkunde, II, S. 46.

[10]) J. Kihara, Kohlenhydrate in der Zwiebel von Allium scorodoprasum L., Proceed. Imp. Acad. Tokyo, 5, 349 nach Chem. Centralbl. 1930, I, S. 696.

phyceen hat A. Fischer[1]) ein neues Polysaccharid als Anabänin (s. d.) beschrieben, welches ein Kondensationsprodukt des Glykogens sein soll. Die angeführten Polysaccharide vertreten die Stärke und kommen gelöst im Zellsafte vor; sie sammeln sich als Reservestoffe bei höheren Pflanzen in den unterirdischen Reservestoffbehältern an, um beim Eintritt der Vegetation als Baustoffe verwendet zu werden.

Roques[2]) benutzt als mikrochemisches Reagens auf Inulin und andere Lävulosane eine essigsaure Benzidinlösung. Man löst 1 g Benzidin in 10 ccm Eisessig und 30 ccm Wasser, indem man zum Sieden erhitzt. Nach Zusatz von Wasser zu 50 ccm läßt man erkalten, filtriert und bewahrt in gelber Flasche. In diese Lösung werden die zu untersuchenden Pflanzenteile eingetaucht. Es bilden sich dann sofort oder spätestens nach 48 Stunden Sphärokristalle, identisch mit denjenigen, die man aus Weingeist erhält.

Sinistrin

Sinistrin ist ein von Schmiedeberg aus den Zwiebeln von Urginea maritima isoliertes Gemisch von Kohlenhydraten, das aus mindestens zwei Bestandteilen besteht. Für die Darstellung ist wichtig, daß Sinistrin nicht durch Bleiessig, aber durch Erdalkalien (Kalkmilch, Barytwasser, Strontianwasser) gefällt wird.

Die Sinistrine sind in Wasser leicht, in Weingeist, Azeton u. dgl. schwer löslich und liefern durch Hydrolyse Fruktose.

Sinistrin A (auch aus Inulin) durch Depolymerisierung zu erhalten ist nach Schlubach und Flörsheim (Ber. deutsch. chem. Ges. 1929, LXII, S. 1191) ein Di-h-Fruktoseanhydrid, Sinistrin B die entsprechende Tetraverbindung.

Sinistrin wird aus gesättigter wässeriger Lösung weder durch Ammonsulfat, noch durch Tannin, Brombromwasserstoff und Silikowolframsäure gefällt.

Für den mikrochemischen Nachweis[3]) können dieselben Reaktionen (auf Fruktose) benutzt werden, die bei Inulin angegeben sind. Zur Ermittlung der Lokalisation kocht man die Schnitte erst mit 80proz. Weingeist aus und legt sie nach Abdunsten des Weingeistes in Strontianwasser (gesättigte Lösung von Strontiumhydroxyd). Es entsteht dann in den Parenchymzellen eine Fällung, die in Essigsäure löslich ist.

Ein Fruktosid, von dem es nicht sicher ist, ob es mit Sinistrin identisch ist, findet sich auch in den Zwiebeln von Urginea Burkeana.

[1]) A. Fischer, Zelle der Cyanophyceen, Bot. Ztg., 1905, LXIII, S. 51.

[2]) H. Roques, Sur un nouveau procédé de localisation dans les végétaux. Son application á leur recherche dans les feuilles de la famille des Composés. Bull. trav. soc. pharm. Bordeaux, III, S. 175, 1926.

[3]) L. Rosenthaler und R. Kohli, Schleim und Sinistrin in Bulbus Scillae, Apotheker-Ztg., 1930, Nr. 71.

Glykogen

1856 entdeckten Cl. Bernard und Hensen das Glykogen der Leber. 1863 machte de Bary auf den stark lichtbrechenden Inhalt der Asci vieler Pilze aufmerksam und 5 Jahre später wurde Glykogen von Kühne in Aethalium septicum nachgewiesen. Reinke und Rodewald[1]) traten bereits für die Identität des tierischen und pflanzlichen Glykogens ein. Seit 1882 beschäftigte sich besonders Errera[2]) mit diesem Körper. Seine zahlreichen Arbeiten wurden von Massart[3]) neu herausgegeben. Das isolierte Glykogen ist ein weißes, amorphes, in Wasser leicht lösliches Pulver. In Glyzerin bei 270° unlöslich (Unterschied von Erythrodextrin, Mameli). Aus der wässerigen Lösung, die opalesziert, wird es durch Barytwasser gefällt, auch durch Tannin, Silikowolframsäure oder Phosphormolybdänsäure. Es reduziert Fehlingsche Lösung nicht und gibt bei der Hydrolyse und bei der Einwirkung von Enzymen (Speichel, Leber, Hefezellen) Traubenzucker. Speichel löst bei 28° das Glykogen innerhalb 24 Stunden aus der geschlossenen Zelle haraus (A. Meyer). Unter den Abbauprodukten des Glykogens finden sich ähnliche Stoffe wie bei der Amylumhydrolyse (Maltose). Die empirische Zusammensetzung ist $C_6H_{10}O_5$ oder $6(C_6H_{10}O_5)+H_2O$ nach Clautriau[4]), welcher im getrockneten Pulver von Boletus edulis 20%, in Amanita muscaria 14%, im Pulver von Saccharomyces 31% Glykogen fand.

Glykogen ist ein bei Pilzen, bei niederen Algen (Cyanophyceen), Bakterien und Protozoen weit verbreitetes, die Stärke vertretendes Kohlehydrat. Nach H. Pringsheim ist es identisch mit der Hüllsubstanz der Stärke. Da Trimethylglykogen und Trimethylstärke identisch sind, nehmen Haworth, Hirst und Webb an, daß auch Stärke und Glykogen chemisch identisch und ihre Unterschiede nur kolloid-chemischer Natur sind (Journ. chem. soc., London, 1929, S. 2479). Es kommt in Zellsaftvakuolen vor. Bei Pilzen wird es aufgespeichert und zum Wachstum der Fruchtträger und zur Sporenbildung aufgebraucht[5]). In Sporen wird kein Glykogen gespeichert, wohl aber in Sklerotien. Über seine Wanderung ist noch wenig ermittelt. Für Flechten ist Glykogen mit Sicherheit nachgewiesen. Auch in der grünen Euglenacee Colacium vesiculosum kommt es nach Errera vor,

[1]) Reinke und Rodewald, Studien über das Protoplasma. 1881.

[2]) Errera, L'Epiplasme des Ascomycètes, Brüssel 1882 und Compt. rend.

[3]) L. Errera, Bibliographie du Glycogène et du Paraglykogène chez les végétaux, Rec. de l'inst. bot. de Bruxelles, 1905, I, S. 382.

[4]) C. Clautriau, Mém. de l'Acad. royal. de Belgique, 1895, LIII und: Étude chim. du glycogène chez les champignons et les levures, Brüssel, F. Hayez, 1895, und: Creighton, Microscop. researches of the formative property of glycogen, London 1896.

[5]) Eine abweichende Angabe macht Ch. Ternetz, die bei Ascophanus carneus selbst nach zweimonatlichem Hungern keine Abnahme der äußerst geringen Mengen von Glykogen beobachtete (Protoplasmabewegung und Fruchtkörperbildung bei A. c. Per., Jahrb.f.wiss. Bot., 1900, XXXV, S. 277). Bei diesem Pilze fanden sich Körnchen, die eine Eigenbewegung besitzen, weder Gerbstoff- noch Jodreaktionen geben, aber Kernfarbstoffe speichern.

ebenso in Schwefelbakterien (Thiocystis violacea, Hinzes Amylin (s. d.) dürfte Glykogen sein). Nach Henneberg[1]) entsteht es in den Hefezellen weder aus „Eiweiß, noch aus Pepton oder Fett“, Glykogenvakuolen sollen nicht existieren, „das Glykogen durchsetzt das Eiweiß“.

In den lebenden Zellen bildet das Glykogen eine farblose, stark lichtbrechende Substanz, die sich mit Jodjodkaliumlösung leuchtend rotbraun färbt. Die Intensität der Färbung ist um so stärker, je mehr Glykogen zugegen ist. Bei Anwesenheit von Spuren erhält man nur eine braune, orange oder selbst gelbe Färbung. Man kann, wie L. Errera[2]) zeigte, aus der Intensität der Reaktion auf die Menge des anwesenden Glykogens schließen, doch muß man dann stets die gleiche Jodlösung benutzen (0,1 Jod, 0,3 Jodkalium, 45,0 Wasser). Selbstverständlich müssen die Präparate bei derartigen Vergleichsversuchen direkt in das Reagens gelegt werden. Benutzt man stärkere Jodlösungen, dann werden auch Spuren von Glykogen intensiver gefärbt. Hat man auf ein in Jodjodkaliumlösung liegendes Präparat Wasser einwirken lassen und zerdrückt man dann die Zellen, so daß die rotbraunen Massen ins Wasser gelangen, so kann man ihr Auflösen im Wasser verfolgen. Mit der Stärke teilt Glykogen die Eigenschaft, daß die Jodfärbung beim Erwärmen verschwindet, um beim Erkalten wieder sichtbar zu werden. Doch muß man, um ein Auflösen zu verhindern, vorsichtig auf 50—60° erwärmen. Bisher ist es noch nicht gelungen, die Jodfärbung des Glykogens haltbar zu machen.

Auf die Gerinnungsfähigkeit des Glykogens hat A. Fischer[3]) den sichersten mikrochemischen Nachweis gegründet. Das Material wird in Weingeist fixiert, die Mikrotomschnitte kommen in Xylol, dann in Weingeist und schließlich ohne den anhaftenden Weingeist zu entfernen in eine 10proz. wässerige Tanninlösung. Nachdem die Präparate 10—15 Minuten lang in der Tanninlösung gelegen haben, werden sie zunächst wiederum ohne Abspülung in eine 1proz, dann in eine 10proz. wässerige Lösung von Kaliumdichromat gebracht. Auch hierin bleiben sie etwa 10 Minuten. Auf diese Weise ist das Glykogen gänzlich unlöslich in Wasser geworden. Es kann nun mit basischen Farbstoffen (Safranin, Bismarckbraun, Jodgrün, Methylenblau) gefärbt werden,

[1]) W. Henneberg, Neuere Unters. über Eiweiß-, Glykogen- und Fetthefezellen, Verh. 83. Nat. Vers. Karlsruhe, 1911, II, 1, S. 240.

[2]) L. Errera, Über den Nachweis des Glykogens bei Pilzen. Bot. Ztg., 1886, XLIV, S. 316 und: Sur le glycogène chez les Basidiomycètes, Mém. de l'Acad. d. Belg., 1885, XXXVII.

[3]) A. Fischer, Eine neue Glykogenfärbung, Anatom. Anzeiger, 1905, XXVI, S. 399.

wird von Safranin leuchtend rot und zeigt die Form, welche es bei der Fixierung mit Weingeist hatte. Zellkerne bleiben hierbei infolge der Tanninbehandlung ungefärbt oder erscheinen durch die Chrombehandlung nur schwach gelblich. Gute Färbungen erhält man mit 10 Minuten langem Färben mit Safranin-Anilinwasser. — Die in der tierischen Histologie benutzten Färbungsmethoden von Vastarini, Best und P. Mayer sind, wie es scheint, auf unserem Gebiete noch nicht erprobt worden. Mayer[1]) sagt auch, daß das Gallein (Grübler) unter Zusatz von Ammoniak in 70proz. Weingeist gelöst, eine sehr präzise Färbung des Glykogens gibt, und zwar ziemlich lebhaft violett.

In der tierischen Histochemie erfreut sich Bests ammoniakalische Karminlösung großen Ansehens zum Nachweis des Glykogens. Sie färbt Stärkekörner nur vereinzelt, Inulin schwach, Zellulose stärker.

Auf der Fällbarkeit durch Tannin beruht folgender Nachweis (A. Meyer)[2]): Legt man Pilzzellen am besten nach 12-stündiger Vorbehandlung mit 80proz. Weingeist 12 Stunden in eine 10proz. wässerige Tanninlösung, wäscht sie schnell in der Zentrifuge zweimal mit Wasser ab und bringt sie alsdann 15 Minuten in eine Ferrichloridlösung (Liquor ferri sesquichlorati 1 : 10), so ist das Glykogen schwarz gefärbt. Behandelt man die gefärbten Zellen unter dem Deckglas mit 1proz. Schwefelsäure, setzt dann nach Verschwinden der Eisenfärbung Jodjodkalium hinzu, so erhält man an den ursprünglich schwarz gefärbten Stellen die Jodglykogenfärbung.

Als Hilfsreaktion wird man schließlich Färbungen mit Rutheniumrot heranziehen können; denn Tobler[3]) fand, daß sich sowohl reines Glykogen (Schuchardt-Görlitz) als auch Glykogen in verschiedenen Präparaten intensiv mit diesem Farbstoffe färbt.

Zum Nachweis von Glykogen in Schnitten verwendet Roques[4]) sein Benzidinreagens (s. S. 309).

Glykogen bildet so doppelbrechende Körnchen, die sich mit Jodjodkalium mahagonibraun färben.

[1]) P. Mayer, Zur Färbung des Glykogens, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 513.

A. Meyer, Morphologische und physiologische Analyse der Zelle S. 263.

[3]) F. Tobler, Über die Brauchbarkeit von Mangins Rutheniumrot als Reagens für Pektinstoffe, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1906, XXIII, S. 182.

[4]) H. Roques, Bull. trav. soc. pharm. Bordeaux, 1926, III. Sur un nouveau procédé de recherche du glycogène, Compt. rend. soc. biol., 1926, XCV, S. 575.

2. Iso- und heterocyklische Stoffe

Brenzcatechin

Brenzcatechin (Orthodioxybenzol, Pyrocatechusäure, Catechol) F. 104° kristallisiert bei der Sublimation in rhombischen Blättchen, aus Lösungen in kurzen Säulen, löst sich leicht in Wasser, Weingeist und Äther, auch in Chloroform, wird mit Alkalien grün, dann braun, schließlich schwarz, mit Ferrichlorid grün, bei nachfolgendem Zusatz von Natriumkarbonat oder Ammoniak violett. Mit Brom bildet sich Tetrabrombrenzcatechin. Brenzcatechin findet sich in den Herbstblättern von Ampelopsis hederacea (Gorup), doch nach Weevers nur in Spuren, ferner in Salix helix, S. alba, S. vitellina, Populus alba, P. monilifera; es ist als Endprodukt der Spaltung und Umbildung von Salicin im Gewebe der Salixarten zugegen und dient wieder zum Aufbau dieses Glykosides. Kurz nach dem Austreiben der Knospen steigt der Gehalt an Brenzcatechin. Die bei der Nekrobiose erfolgende Schwarzfärbung der Salixblätter hängt mit der Gegenwart des Brenzcatechins zusammen[1]). In größerer Menge entsteht es bei der trockenen Destillation von Kino, Catechu und anderen Harzen.

Fig. 67. Brenzcatechin, Sublimat des Ätherauszuges von Salixknospen (Tunmann)

Weevers[2]) wies Brenzkatechin mit Ferrichlorid und Sodalösung nach. „Die Schnitte wurden in verdünnte Ferrichloridlösung gelegt, nach einigen Minuten abgespült und eine ziemlich konzentrierte Natriumhydrokarbonatlösung hinzugefügt.“ Brenzkatechin läßt sich mit Äther ausziehen. Der Rückstand des Auszuges zeigt Kristalle, die mit Ferrichlorid blaugrün, mit Bromwasser schmutzig rosafarbig werden. „Gebrannter Kalk gibt in konzentrierter erwärmter Lösung einen starken Niederschlag prachtvoll polarisierender Stäbchen mit gerader Auslöschung, meistens sternförmig geordnet und von hellgelber Färbung.“ Brenzkatechin reduziert Silbernitrat in der Kälte und sublimiert leicht.

Die Sublimation hat Weevers zu vergleichenden quantitativen Bestimmungen nutzbar gemacht. Das Material wird mit Äther ausgezogen, der Auszug vom Äther befreit, der Rückstand in absolutem Alkohol aufgenommen, die alkoholische Lösung wird eventuell eingeengt. Die konzentrierte Lösung wird mit Hilfe des Wysmanschen kupfernen

[1]) Th. Weevers, Betrachtungen und Untersuchungen über die biose und die letale Chloroformeinwirkung, Rec. d. trav. bot. Néerland., 1912, IX, S. 279.

[2]) Th. Weevers, Die physiologische Bedeutung einiger Glykoside, Jahrb. f. wiss. Bot., 1904, XXXIX, S. 229.

Täfelchens sublimiert, da alkoholische Lösungen beim Erhitzen breit fließen. Die Kupfertafel hat eine Öffnung (1 cm groß), auf die ein Glimmerplättchen nebst Asbestring kommt. Die Kupferplatte wird vorgewärmt, die Lösung tropfenweise in den Asbestraum der Glimmerplatte gebracht und dann wird auch die Glimmerplatte erwärmt. Derart verdampft die Lösung langsam. Nun wird ein Objektträger auf den Asbestring aufgelegt und weiter erwärmt. Die erhaltenen Sublimate (Fig. 67) werden mit Sublimaten von bestimmtem Gehalt verglichen. Das Verfahren gestattet „eine Genauigkeit bis auf Milligramme". — Mosimann erhielt Sublimate von Brenzkatechin, als er Gambir, Catechu (von Acacia Catechu) und das Kino von Pterocarpus marsupium im Rosenthalerschen Apparat der Vakuum-Sublimation unterwarf.

Brenzkatechin, das in Sublimaten auftritt, kann von Protokatechusäure oder anderen Derivaten des Brenzkatechins herrühren.

Benzoesäure

Benzoesäure, überwiegend ein Bestandteil pflanzlicher Sekrete (Siambenzoe bis zu 25%, Tolubalsam, Akaroidharz, Perubalsam, Styrax, Myrrha, Ylang-Ylang-Öl von Cananga), tritt darin teils frei, teils in Gestalt von Estern auf. Sie wird angegeben für Salvia sclarea (Braconnot), Asperula odorata, Holcus odoratus (Vogel), Ceratonia siliqua (Grünzweig). In der Preißelbeere, wo sie als Benzoylglykose vorkommt, fand sie O. Loew (bis zu 0,5% in getrockneten Früchten, Mason, Kanger), hier erfolgt bei der Reife ein Ansteigen des Benzoesäuregehaltes. In geringer Menge wurde sie von Nestler in der Moosbeere (Vaccinium oxycoccus L.) ermittelt. Eine Dibenzoyl-Xyloglykose findet sich in Daviesia latifolia. (Im Tierreich fand sie Wöhler im Castoreum). In Pinguicula vulgaris schützt sie die gefangenen Insekten vor Fäulnis (O. Loew und K. Aso, 1907).

Trotzdem die Sublimationsfähigkeit der Benzoesäure seit Anfang des 17. Jahrhunderts bekannt ist, wurde diese Eigenschaft erst 300 Jahre später zum mikrochemischen Nachweis in pflanzlichen Geweben von Nestler[1]) herangezogen. Der Rezipient ist während der Sublimation durch Wassertropfen zu kühlen (Verfahren S. 31, Fig. 8), das Sublimat ist sofort mikroskopisch zu prüfen, da zarte Beschläge bei Zimmertemperatur nach wenigen Stunden, starke Beschläge nach mehreren Tagen, vollständig verschwinden. Die heraussublimierten Kristalle sind schiefe rhombische Prismen (monoklin), die unter Deckglas in kaltem Wasser sich nur langsam lösen (in 470 Teilen), aber leicht löslich sind in Weingeist, Äther und Chloroform. Aus diesen Lösungen scheidet

[1]) A. Nestler, Ein einfaches Verfahren zum Nachweise der Benzoesäure in der Preißelbeere und Moosbeere, Ber. d. bot. Ges., 1909, XXVII, S. 63.

sich die Benzoesäure beim Verdunsten des Lösungsmittels in charakteristischer Form wieder aus. Löst man die Kristalle in verdünnter Natronlauge ($n/_{10}$), dann scheiden sich auf Zusatz eines kleinen Tropfens Salzsäure (spez. Gew. 1,092) sofort langgestreckte Kristallfelder ab, „die aus vielen annähernd in gleicher Richtung aneinandergereihten rektangulären Lamellen bestehen" (Haushofer)[1]. Die Kristalle der Benzoesäure lösen sich in Ammoniak; die ammoniakalische Lösung gibt nach dem Eintrocknen auf Zusatz von verdünnter Ferrichloridlösung einen roten Niederschlag (Ferribenzoat). Die verdünnte Lösung eines benzoesauren Salzes (benzoesaures Natrium) gibt mit Silbernitrat charakteristische Kristalle von Silberbenzoat (sehr dünne, gerade auslöschende Lamellen und scharfkantige Prismen (Fig. 68 b). Sie können mit heißem Wasser umkristallisiert werden. Aus Lösungen von freier Benzoesäure scheidet sich Silberbenzoat auf Zusatz von Silbernitrat und Natriumazetat aus. Man kann auch ein Sublimat von Benzoesäure mit einer gesättigten Lösung von Silberazetat erwärmen. Die Nadelbüschel des Silberbenzoats sind nicht mit den Nadeln und Spießen des Silber- azetats zu verwechseln.

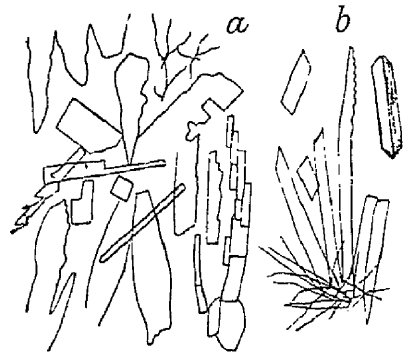



Fig. 68. Benzoesäure; *a*) Kristallformen im Sublimat von Vaccinium myrtillus, bei *b*) in benzoesaures Silber übergeführt (Tunmann)

Gibt man zur Lösung der Benzoesäure in einem Tröpfchen heißem Wasser ein Körnchen Merkuriazetat, so entstehen teils Nadeln, teils federartige Gebilde.

Mit Hilfe der direkten Sublimation wies Nestler Benzoesäure nach in Preißelbeeren (Fig. 68 a), Moosbeeren, Benzoeharz und Tolubalsam. Zum Nachweis genügt eine einzige getrocknete Preißelbeere, die etwa 0,0001 g Benzoesäure führt. In der Preißelbeere ist Benzoesäure in der Wachsschicht enthalten, denn wenn man das Wachs in Äther löst (durch ganz flüchtiges Übergießen der Früchte mit Äther), so erhält man aus dem Ätherrückstand Benzoesäuresublimate. Es fragt sich aber, ob die Säure in das Wachs nicht erst beim Trockenprozeß gelangt ist. Sie läßt sich ferner durch direkte Sublimation ermitteln in der Epidermis (der vom Wachs befreiten Früchte) und im Fruchtfleisch, im Samen aber erst in dem Ätherauszuge von etwa 50 zerkleinerten Samen.

Bei Pinguicula vulgaris legt Marpmann[2]) auf eine Glimmerplatte von 30×80 mm Größe und 0,2—0,3 mm Dicke einen Metallring von

[1]) K. Haushofer, Mikroskopische Reaktionen, Braunschweig 1885, S. 72.

[2]) G. Marpmann, Über Befunde von Benzoesäure in Pinguicula vulgaris, Zeitschr. f. angew. Mikr., 1908, XIV, S. 1.

15 mm Höhe und 15—20 mm Durchmesser, füllt die zerriebene Substanz ein, bedeckt mit dem Objektträger, stellt die beschickte Glimmerplatte auf eine Metallplatte und erwärmt.

Auch bei der Sublimation einer Spur Perubalsam oder Styrax auf der Asbestplatte erhalten wir besonders in den ersten Sublimaten Benzoesäure und Ester derselben, während die, bei höherer Temperatur gewonnenen, letzten Sublimate Zimtsäure (s. d.) führen. In den bei höherer Temperatur gewonnenen Sublimaten der Cocablätter trifft man zuweilen ebenfalls Benzoesäure an.

Protokatechusäure

Protokatechusäure (3—4-Dioxybenzoesäure) entsteht aus vielen Harzen (Kino, Benzoe, Akaroid, Myrrha u. a.) bei der Kalischmelze, findet sich in den Früchten von Illicium verum (Oswald) und religiosum (Eykman), sowie in den Blättern von Vitis vinifera (Boettinger) und in Zwiebelschalen. In reinem Zustande kristallisiert sie in gelblichen Nadeln, die bei 199° schmelzen, bei höherer Temperatur in Kohlensäure und Brenzcatechin zerfallen.

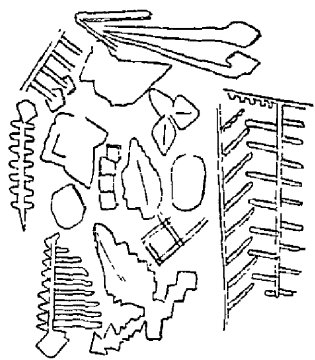



Fig. 69. Protokatechusäure, Kristalle im Mikrosublimat de· Illiciumfrüchte (Tunmann

Protokatechusäure reduziert Silbernitrat und gibt mit Bleiazetat einen amorphen Niederschlag. Bringt man zu einem Körnchen Protokatechusäure einen Tropfen Merkuriazetatlösung, so bilden sich unter Bräunung Nädelchen zum Teil in Drusen und verzweigten Aggregaten.

Man wird bei Illicium-Früchten die Sublimation heranziehen. Doch ist es notwendig, etwas mehr Substanz (0,08—0,1 g Pulver) auf einmal zu verarbeiten. Außerdem ist es vorteilhaft, das Pulver auf dem Glase zuvor mit 2—3 Tropfen Wasser gut zu durchfeuchten. Die Höhe des Flammenkegels beträgt 4 cm, die Spitze der Flamme soll die Asbestplatte berühren. Die ersten Sublimate enthalten naturgemäß reichlich Wassertropfen, vermischt mit fettem Öle, welches zuweilen kristallinisch erstarrt. Bereits im 3. Sublimat, mehr in den folgenden, treffen wir zahlreiche Kristalle an. Die Kristalle entstehen meist nach kurzer Zeit, vereinzelt erst nach einigen Stunden, sind von hyaliner Beschaffenheit, anfangs rein weiß, später gelblich und verflüchtigen sich selbst nach Monaten nicht an der Luft bei 20—30° (Unterschied von Sublimaten der Benzoesäure). Die Kristalle sind recht charakteristisch tannenbaum- und gitterartig angeordnet, meist kleine Nadeln und Blättchen. Letztere sind zu herzförmigen und federartigen Gebilden vereint (Fig. 69). Diese Kristalle finden sich in den Sublimaten, die bei mikroskopischer Betrachtung weiß oder doch nur gelblich erscheinen (s. auch Shikimisäure),

lösen sich in Wasser, Weingeist und Äther. In verdünntem Ferrichlorid (1 : 10) bilden sich teils sofort grünschwarze schaumige Tropfen, teils läßt sich am Rande des Tropfens eine gelbe, dann rote und schnell dunkelgrün werdende Färbung feststellen. Man läßt eintrocknen und bringt seitwärts einen Tropfen Sodalösung (1 : 20), den man mit der Nadel mit dem eingetrockneten Rückstand verbindet. Derart läßt sich unter dem Mikroskop der Übergang der grünen Färbung in Blau, schließlich in Braunrot verfolgen. Ammoniak löst farblos und gibt einen annähernd farblosen Rückstand, Brenzkatechin fehlt. Wahrscheinlich sublimiert die Protokatechusäure vollständig heraus, ehe die zur Spaltung nötige Temperatur erreicht ist. Brenzkatechin gibt ebenso wie Protokatechusäure, Kaffeesäure und Chlorogensäure die Reaktion mit Ferrichlorid-Soda. Kaffeesäure löst sich schwer in Wasser; Chlorogensäure ist in Äther nach Gorter unlöslich. Protokatechusäure scheint in Illicium vornehmlich in den äußeren Zellreihen der Karpelle lokalisiert zu sein.

Ellagsäure

Ellagsäure bildet hellgelbe, in Wasser und in Weingeist unter Deckglas unlösliche Kriställchen, die sich in nitrithaltiger Salpetersäure blutrot lösen. Die alkalischen Lösungen sind gelb, nach einiger Zeit rot; Ferrichlorid färbt dunkelblau. In kleiner Menge ist Ellagsäure, die im Pflanzenreich weit verbreitet ist, u. a. in Galläpfeln, Himbeeren und in gerbstoffhaltigen Rinden (Punica granatum, Potentilla tormentilla, Quercus) aufgefunden.

Eingehende mikrochemische Untersuchungen liegen nicht vor; nur Gibelli[1]) hat Ellagsäure im kristallinischen Zustande im Gewebe erkrankter Kastanien (Stamm und Wurzel) angegeben. Die ausgeschiedenen Sphärokristalle lösten sich in Wasser und Alkalien, in Kaliumkarbonatlösung mit gelber, in Salpetersäure mit granatroter Farbe und wurden mit salpetersaurem Silber rotbraun, mit Ferrichlorid grünschwarz. Sie fanden sich im Bast, im Phelloderm, bisweilen im Holzparenchym und in der Nähe der größeren Gefäße. Da Ellagsäure aber in Wasser unlöslich ist, so muß es sich bei diesen Kristallen um etwas anderes handeln.

Chinasäure

Die Chinasäure (Tetraoxy-Hexahydrobenzoesäure) tritt in Hydrochinon oder Arbutin führenden Ericaceen auf, in größerer Menge (5—8 %) in Cinchonen. Chinasäure bildet in jungen Zweigtrieben von Picea excelsa 10 % des Trockengewichts (Kiesel). Die Säure ist für niedere Pflanzen nach Nägeli und Czapek eine vorzügliche Kohlenstoffquelle, die Traubenzucker zu ersetzen vermag. In reinem Zustande kristallisiert sie in farblosen Prismen F. 161,5°. Leicht in Wasser, schwer in Weingeist löslich, in Äther fast unlöslich.

[1]) G. Gibelli, Nuovi studi sulla malattia del Castagno, Bologna, 1883, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, S. 137.

Reine Chinasäure läßt sich am Objektträger aus Wasser oder Weingeist nur schwierig umkristallisieren, die Kristalle entstehen an der Luft erst nach einigen Tagen und überwiegend in Zerrformen. Bei der Sublimation erhält man mattglänzende Sublimate, die sofort kristallinisch werden. Die Kristalle verflüchtigen sich nicht bei längerem Liegen der Präparate an der Luft. Die bei sehr starkem Erhitzen der Chinasäure auftretenden Spaltlinge: Hydrochinon, Brenzkatechin, Benzoesäure u. a. sind in den Sublimaten nicht zugegen. Die Sublimate bestehen aus Chinasäure; wahrscheinlich ist Chinid ebenfalls zugegen. Reine Chinasäure und die Sublimate geben mit Kalkwasser in sehr kurzer Zeit typische Kristallformen, die jedenfalls chinasaures Kalzium darstellen (Fig. 70e). Bei der Sublimation von Chinarinde erhalten wir in den farblosen und ganz schwach rosa gefärbten Sublimaten (s. Cinchona-Alkaloide) analoge Kristalle. Die außerhalb der zierlichen Figuren auftretenden scharfkantigen größeren Kristalle scheinen Chinasäure zu sein (Fig. 70a), zumal sie sich unter Deckglas nicht in Äther oder Chloroform lösen. Es ist beachtenswert, daß die Säure gleichzeitig mit den Alkaloiden sublimiert, so daß es nicht ausgeschlossen ist, daß im Sublimat ein Teil der Alkaloide als chinasaures Salz vorliegt.

Fig. 70. Kristallformen im Sublimat von Cinchona calisaya (Rindenpulver); *a*) wahrscheinlich Chinasäure, *b*) und *c*) überwiegend Alkaloide; im Sublimat mit Wasser (*d*) und mit Kalkwasser (*e*) erhaltene Kristalle von Chinasäure(?) (Tunmann)

Shikimisäure

In den Früchten von Illicium religiosum und verum und in den Blättern von Gingko biloba.

Mikro-F. 184°. Löslich in Wasser und Weingeist, unlöslich in Äther, Chloroform, Benzol, Petroläther. Die wässerige Lösung der Kristalle reduziert sofort eine sodaalkalische Permanganatlösung. Keine Fällung mit Bleiazetat oder Bleiessig.

Wir können zum Nachweis mit Erfolg die Mikrosublimation benutzen und sublimieren in der S. 32 angegebenen Weise oder in der Molischschen Glaskammer einige Zentigramm durchfeuchteten Pulvers der Illiciumfrüchte. Die Sublimation gelingt auch bei Verarbeitung mehrerer Schnitte. Die ersten Sublimate führen ätherisches Öl und

Spuren von Protokatechusäure, die folgenden Protokatechusäure und Anteile von Fettsäuren, die letzten gelblichen Sublimate überwiegend Shikimisäure. Die Kristalle der Shikimisäure erscheinen über das ganze Sublimat zerstreut als farblose oder doch nur schwach gelbliche massive Nadeln und Körnchen (im Gegensatz zu den hyalinen und hellen der Protokatechusäure); sie liegen isoliert oder zu drusenartigen Gruppen vereint. Diese Kristalle sind unlöslich in Chloroform; ihr scheinbares Verschwinden in Chloroform beruht auf optischen Ursachen (Brechungsindex), denn nach dem Verdunsten des Chloroforms finden sich die Kristalle in gleicher Gestalt und am gleichen Orte vor. Sie sind ferner unlöslich in Benzol, Äther und Petroläther, lösen sich in Wasser, Chlorzinkjod, Essigsäure, Chloralhydrat, Ammoniak, Vanillinsalzsäure und Ferrichlorid farblos. Bei gekreuzten Nicols leuchten sie gelb auf; hierbei bemerkt man in den fettglänzenden Tropfen (s. auch S. 259) farblos leuchtende Nädelchen, die Fettsäuren sind. Während Shikimisäure sich in wässeriger Chloralhydratlösung sofort löst, bleiben die Fettsäurekristalle zunächst erhalten, um nach einigen Minuten in Tröpfchen überzugehen. Die fettsäurehaltigen Tropfen lösen sich überdies leicht in Chloroform. Die Kristalle der Shikimisäure lösen sich in Salpetersäure farblos; die zuweilen in den Sublimaten vorübergehend auftretende schwache Rötung wird durch Beimengungen verursacht, ebenso jedenfalls die gelbe bis rosa Färbung, die nitrithaltige Schwefelsäure hervorruft.

In den Samen von Illicium verum und religiosum konnte E. Siersch[1]) Shikimisäure nicht nachweisen.

Zimtsäure

Zimtsäure (β-Phenylacrylsäure) kommt frei und als Ester vorzugsweise in Sekreten vor: in den Liquidambarbalsamen (Styrax und in denen aus Amerika), im Tolubalsam, in der Sumatrabenzoe, im ätherischen Öle von Alpinia galanga und moluccensis; sie ist gefunden worden in Scrophularia nodosa, Erythroxylon coca, Thea spec., Globularia-Arten u. a. Aus Wasser scheidet sie sich in Nadeln, aus Weingeist in rhombischen Prismen F. 133° ab, die sich schwer in kaltem Wasser (1 : 3500), leicht in heißem Wasser oder Weingeist lösen.

Reine Zimtsäure sublimiert leicht unzersetzt am Objektträger. Die Kriställchen scheiden sich in wenigen Augenblicken ab und polarisieren lebhaft, anfangs grau, später farbig. Selten entstehen kurze Nadeln (10 μ), meist recht charakteristische Blättchen, die oft zu mehreren verwachsen. Die schönsten Kristalle sind am Rande des Sublimates. Bei der Sublimation von 0,01 g Balsam von Liquidambar orientalis (Styrax),

---

[1]) E. Siersch, Zur Mikrochemie von Illicium verum Hook. und Illicium religiosum Sieb. Pharm. Zentralh., 1928, LXIX (1928), S. 581.

von Myroxylon toluifera (Tolubalsam) oder von M. balsamum (Perubalsam) auf der Asbestplatte erhalten wir (Fig. 71) bis 10 starke Sublimate, die vollständig kristallinisch ausfallen. Die Kristalle sind größer entwickelt als die der chemisch reinen Zimtsäure, zeigen aber meist die gleichen Formen (bis 300 μ große Täfelchen und 150 μ große monokline Kristalle) und lösen sich in Wasser, doch langsamer als Benzoesäure. Das Sublimat mit einem Tropfen Kaliumpermanganat bedeckt, entwickelt sofort Benzaldehyd-Geruch (Unterschied von Ferulasäure, S. 325). In den Balsamen findet sich zuweilen neben Zimtsäure auch Benzoesäure. Die Unterscheidung beider Säuren ist leicht. Die Benzoesäure-Kristalle erscheinen bei gekreuzten Nicols nur grau, löschen nicht vollständig aus, sind selten gut ausgebildet. Die Kristalle der Zimtsäure (und ihrer Ester) leuchten prächtig in allen Farben auf, besitzen schiefe Auslöschung und sind vorzüglich entwickelt (Fig. 71). Selbst die Zerrformen der Zimtsäure, die aus kleinen Täfelchen zusammengesetzt sind, zeigen diese Eigenschaften, während die Benzoesäure im limat sehr unscheinbar zur Abscheidung gelangt, so daß man bei gewöhnlicher Beleuchtung stark abblenden muß, um ihre Formen zu erkennen. Beim Liegen der Sublimate an der Luft verflüchtigt sich die Benzoesäure spätestens nach mehreren Tagen vollständig.

Fig. 71. Zimtsäure, Kristalle im Sublimat: *a*) aus reiner Zimtsäure, *b*) aus Styrax (zum Teil Ester), *c*) aus Tolubalsam, *d*) aus Perubalsam (zum Teil Ester); *e*) Dibromzimtsäure aus *b*, *c* und *d* mit Bromdampf am Objektträger erhalten (Tunmann)

Bei Zusatz von Silbernitrat werden die Kristalle der Zimtsäure und ihrer Ester unansehnlich, zum Teil braun, verlieren bei gekreuzten Nicols ihre prächtigen Farben und leuchten nur noch schwach grau auf; zum großen Teile gehen sie in Lösung. Die Benzoesäure-Kristalle lösen sich ebenfalls, erscheinen aber bald in besser ausgebildeten, lebhaft polarisierenden Kristallen von benzoesaurem Silber. Bromdämpfe verwandeln Zimtsäure zunächst in braungelbe Tropfen; Benzoesäure bleibt farblos, die Kristalle lösen sich zum Teil. Hat das Zimtsäure-Sublimat etwa ½ Stunde auf der Bromflasche gelegen, dann fügt man eine Spur Schwefelkohlenstoff zu, bedeckt mit dem Deckgläschen und läßt einige Zeit liegen. Wir finden nun die Dibromzimtsäure in büschel-

förmig angeordneten Blättern auskristallisiert. Die Kristalle stehen meist senkrecht auf dem Objektträger und erscheinen so als feine Nadeln (Fig. 71e). Emich (Mikroch.) läßt die Reaktion „in einer zugeschmolzenen Kapillare oder im verkorkten Spitzröhrchen" ausführen. Sie gelingt aber auch am Objektträger und selbst ohne Schwefelkohlenstoff, allein durch Bromdampf. Zimtsäure läßt sich jedenfalls aus pflanzlichen Sekreten direkt heraussublimieren. Sie liefert derart typische und leicht zu identifizierende Kristalle, daß ihre Bestimmung vorteilhafter durch Sublimation als auf makrochemischem Wege zu erbringen ist.

Gegen Quecksilberazetat verhält sich Zimtsäure wie Benzoesäure (s. S. 315).

Styracin, der Zimtsäure-Cinnamylester, der im Styrax die Zimtsäure begleitet, liefert in reinem Zustande nur tropfenförmige Sublimate. Zimtsäure löst sich unter Deckglas sofort in Weingeist, Styracin nicht. — **Zimtsaures Benzyl** (Kahlbaum) besteht aus Nadeln; im Sublimat findet man fast nur flüssige Kristalle.

Cumarin

Cumarin (Cumarsäureanhydrid) bildet weiße säulenartige Kristalle (Schmelzpunkt bei 67°), die leicht in fetten Ölen, Ammoniak, Kalilauge, Essigsäure, Alkohol, Äther, heißem Wasser, aber langsam und wenig in Glyzerin und in kaltem Wasser löslich sind und unzersetzt sublimieren. Cumarin wird in einfacher Weise aus Tonkabohnen durch Ausziehen mit Weingeist gewonnen (Ausbeute 1,5 %, doch bis 10 % ,Senft). Die Art des Auftretens und die biologische Aufgabe des Körpers sind unbekannt. Der Cumaringeruch macht sich erst beim Welken der Pflanzen bemerkbar, wird bei lebenden Pflanzen mit nicht zu starker Kutikula durch Nekrobiose (Chloroform, Äther, Chlormethyl)[1] hervorgerufen oder durch Belichtung mit ultravioletten Strahlen[2]).

v. Lingelsheim[3]) fand Cumarin in den Blättern von Prunus avium, Pr. fruticosa und Pr. fruticosa × Cerasus, wenn er vorher die Dämpfe von Ammoniak oder anderen nekrobiotischen Stoffen einwirken ließ. Werden die Blätter vorher kurze Zeit in kochendem Wasser gebrüht, so tritt die Cumarinbildung nicht ein.

Cumarinpflanzen sind nach der Literatur:

Aceras anthropophora, Achlys triphylla, Adianthum-Arten, Ageratum mexicanum, Ageratum conyzoides Alyxia stellata, Angraecum fragrans, Anthoxanthum odoratum und Puelli, Artemisia dracunculus L., Asperula odorata (in allen oberirdischen Teilen), Basanacantha spinosa var. ferox Schum., Borreria, Ceratophyllum gummiferum und apetalum, Cheilanthes, Chrysanthemum segetum, Chrysophyllum imperiale, Cinna arundinacea, Copaifera Salikounda, Diodia, Dipteryx odorata, oppo-

[1]) Ed. Heckel, Compt. rend., 1910, CLI, S. 128.

[2]) Pougnet, Compt. rend., 1910, CLI, S. 566.

[3]) A. v. Lingelsheim, Über neue Cumarinvorkommen in einheimischen Pflanzen, Festschrift f. A. Tschirch, 1926, S. 149.

sitifolia, oleifera, Pteropus, Eupatorium triplinerve und leyanum, Galium triflorum, Hemidesmus, Herniaria glabra, Hierochloa-Arten, Humea, Lactucarius, Lavandula off., Liatris odoratissima und spicata, Lindsaea cultrata, Macrosiphonia Velamo, Melilotus officinalis, altissimus, albus, hamatus, leucanthus, Melittis Melissophyllum, Milium effusum, Mitracarpum, Myroxylon Pereirae und toluiferum, Nigritella angustifolia, Orchis fusca, conopsea, odoratissima, Simia, militaris, galeata, coriophora, Peristrophe angustifolia, Phoenix dactylifera, Polypodium, Prunus mahaleb, avium, fruticosum, fruticosum × cerasus. Rhinacanthus communis, Rudbeckia speciosa und wahrscheinlich auch laciniata, Russula, Ruta graveolens, Spermacoce, Stenolobium stans, Tabebuia cassinoides, Talauma ovata, Trilisia, Vitis sessilifolia (Knollen).

In einigen Pflanzen kommt Cumarin ganz oder teilweise in gebundenem wahrscheinlich glykosidischem Zustande vor, so noch Wuite[1]) in Asperula odorata, in den Samen und Keimpflanzen von Melilotus officinalis (in letzteren ausschließlich gebunden) und in Prunus mahaleb. Die in den genannten Pflanzen vorhandenen Cumarin-Verbindungen werden durch Emulsin gespalten.

Siehe auch Cumaringlykosid.

Ein Pseudocumarin soll sich in der Moracee Dorstenia Kleineana und der Leguminose Coronilla scorpioides vorfinden.

Den mikrochemischen Nachweis durch Mikrosublimation führte Nestler[2]) ein. Bei den Samen von Dipteryx odorata (Tonkabohnen) erhält man mit 0,005 g schweren Fragmenten der Kotyledonen ein Sublimat von undeutlich ausgebildeten Prismen, die zu gekrümmten Gebilden vereint sind. Sie besitzen starken Cumaringeruch, verflüchtigen sich allmählich an der Luft und zeigen die oben angeführten Löslichkeitsverhältnisse. Setzt man zur Lösung des Sublimates in verdünnter Natronlauge etwas verdünnte Essigsäure hinzu, dann entstehen lange Kristallnadeln und kleine Prismen. Bei Ageratum mexicanum fehlt Cumarin in den Wurzeln. Das Sublimat der Blätter besteht aus bis 1 cm langen Kristallnadeln, kleinen Prismen und Kombinationen, sowie aus Aggregaten, die feine Querstreifung erkennen lassen. Asperula odorata zeigt im Sublimat Prismen und Nadeln; Hierochloa australis, odorata und Anthoxanthum odoratum zeigen außerdem büschelförmige Aggregate. Prunus mahaleb führt Cumarin in den Blättern, in der Rinde und im Holz. Im Sublimat bilden sich bis 120 μ lange und 4 μ breite Prismen.

Im allgemeinen ist die Kristallform des sublimierten Cumarins wenig beweisend. Aus den sublimierten Wassertropfen bilden sich zunächst kraterförmige Gebilde, dann moosförmig verzweigte Formen,

[1]) N. Wuite, Bijdrage tot de kennis van Cumarine en cumarinehoudende planten, Diss. Amsterdam 1913.

[2]) A. Nestler, Der direkte Nachweis des Cumarins und Theins durch Sublimation, Ber. d. bot. Ges., 1901, XIX, S. 354.

schließlich längere gebogene Kristallfäden, die aus Einzelkristallen bestehen und an die kleinere Prismen ansetzen. Am häufigsten erhält man kleine gebogene Kristalle. Ähnliche Kristallformen erhält man aus vielen Blüten, die kein Cumarin enthalten. Es empfiehlt sich, das Rohsublimat umzusublimieren; man erzielt dadurch bessere Kristalle. Das Sublimat muß sofort durchmustert werden, denn bei längerem Liegen an der Luft werden die Kristalle undeutlich, zerfließen und verflüchtigen schließlich. Cumarinhaltige Drogen geben noch nach längerer Aufbewahrung schöne Sublimate. Blätter von Liatris odoratissima, die 6 Jahre in einem Beutel aufbewahrt waren, gaben Tunmann ein starkes Sublimat (Fig. 72a). Die Dauer der Mikrosublimation richtet sich nach der Menge des vorhandenen Cumarins, weit mehr aber nach der Beschaffenheit der Gewebe. Um die geringen Spuren des in den Blattstielbasen von Liatris enthaltenen Cumarins nachweisen zu können, muß die Sublimation wenigstens dreimal so lange dauern als bei Verarbeitung der Blattspreite. Die Sublimation gestattet eine annähernde Lokalisationsermittlung. Die Trennung der einzelnen Gewebeschichten, die gesondert der Sublimation unterzogen werden, muß an frischem Material vorgenommen werden, da Cumarin leicht an sekundäre Lagerstätten gelangt.

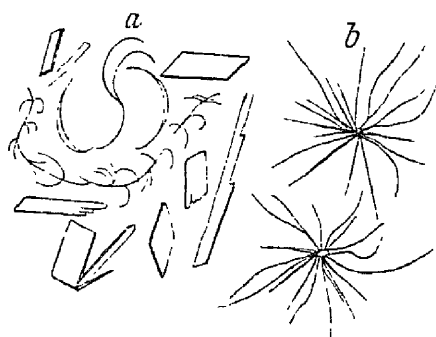



Fig. 72. Liatris odoratissima, *a*) Cumarinkristalle im Mikrosublimat, *b*) Jodverbindung des Cumarins (mit Chlorzinkjod) (Tunmann)

Die Sublimate müssen unter allen Umständen chemisch identifiziert werden — was nicht immer geschehen ist — ehe sie als Cumarin angesprochen werden. Dazu eignet sich das von Senft entdeckte Verhalten zu Chlorzinkjod. Mit Chlorzinkjod entstehen sehr lange und zarte, hin- und hergebogene, schmutzigbräunlich-violette Kristallfäden, welche sich zu Büscheln vereinigen (Fig. 72b).

Die Reaktion wird empfindlicher, wenn man eine wässerige Jodjodkaliumlösung benutzt. Man wendet sie nach Wuite mit Vorteil bei sehr dünnen Sublimaten an, bei dickeren ist weingeistige schwache Jodlösung vorzuziehen. Das Cumarin löst sich zunächst auf; die Lösung hinterläßt nach dem Verdunsten die charakteristischen Formen der Jodverbindung.

van Ziip[1]) empfiehlt folgendes Verfahren: Man verrührt einen kleinen Teil des Sublimates mit einem kleinen Tropfen Wasser, fügt

[1]) van Ziip, Mikrochemischer Cumarinnachweis, Pharmaceut. Weekbl., 1927, S. 841.

soviel Kongorot hinzu, als an einer Platinnadel hängen bleibt und bringt einige Kriställchen von Quecksilberchlorid in die Mitte des Präparats. Es entstehen zahlreiche lange Nadeln.

Behrens gibt noch folgende Reaktion an: Das durch wiederholtes Abdampfen mit weingeistiger Natronlauge entstandene Cumarat bildet mit Thallonitrat schwefelgelbe Prismen, deren mit Essigsäure angesäuerte Lösung gekrümmte Kreuze von rhombischen Kriställchen gibt. Mit dem Chlorzinkjod-Verfahren konnte Senft den Beweis erbringen, daß in der Tonkabohne das Cumarin in den Zellen der Keimblätter im fetten Öle gelöst auftritt. Die Fruchtschale enthält kein Cumarin, wohl aber der reife und der unreife Samen[1]). Durch Schrumpfung der peripheren Gewebe wird das cumarinhaltige fette Öl herausgepreßt und das Cumarin gelangt auf der Oberfläche der Samenschale und zwischen den Keimblättern zur Ausscheidung.

Über Lokalisation des Cumarins in den Pflanzenorganen und über dessen Lichtabsorption s. T. Asai, Acta phytochimica, 1930, V, S. 9; Zentralbl., 1930, II, S. 408.

Chlorogensäure

Chlorogensäure, ein im Pflanzenreich weit verbreitetes Depsid aus Kaffeesäure und Chinasäure, bildet Büschel von Kristallnadeln, die bei 207—208° schmelzen. Löslich in etwa 25 Teilen Wasser, leicht in Weingeist und Azeton, nicht in Äther.

Tunmann[2]) fand sie einmal kristallinisch auf dem Endosperm von Strychnos nux vomica L. in Form feiner, rein weißer, mit dem Auge sichtbarer Flecken.

Schimmelpilze zersetzen sie, indem sie Kaffeesäure übrig lassen.

Die weingeistige Lösung der Säure gibt mit weingeistiger Kalilauge einen intensiv gelben Niederschlag. Bleiazetat gibt gelben, Uranylazetat in konzentrierter Lösung rotbraunen Niederschlag, in verdünnter ebensolche Färbung.

Der Nachweis der Chlorogensäure läßt sich mit geringem Aufwand an Material erbringen. Es sei daher die Methode von Gorter[3]) mitgeteilt: 10 g frühmorgens gepflückte und frisch zerschnittene Blätter werden 1 Stunde mit 50 ccm Salzsäure am Rückflußkühler gekocht (10 ccm konz. Salzsäure + 40 ccm Wasser). Das Filtrat wird mit 15 ccm Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wird abgehoben; sie ist gelb und fluoresziert blau, wird mit Natriumbikarbonat geschüttelt, zweimal mit Wasser gewaschen und schließlich auf 4 ccm Wasser gegossen, das 1 Tropfen 5proz. Ferrichlorid enthält. Beim Umschütteln entsteht

[1]) Em. Senft, Über das Vorkommen und den Nachweis des Cumarins in den Tonkabohnen, Pharm. Praxis, 1904, III, Heft 3, Sep.

[2]) O. Tunmann, Auftreten eines kristallisierten Körpers im Samen von Strychnos nux vomica L., Pharmazeut. Post, 1918, LI, S. 341.

[3]) K. Gorter, Sur la distribution de l'acide chlorogénique dans la nature, Ann. de Buitenzorg., 1909, XXIII, S. 69.

nach 1—2 Minuten eine Violettfärbung der wässerigen Schicht, die Farbe verblaßt nach einiger Zeit; der Äther wird gelb. Die Reaktion beruht auf Oxydationsvorgängen und ist so scharf, daß sie oft schon mit 1 g gelingt, so nach Charaux[1]) bei Ballota foetida. Dieser Forscher kocht die Pflanzenteile mit 5—10 proz. Schwefelsäure, nimmt das Filtrat mit Äther auf, schüttelt die ätherische Lösung mit $\frac{1}{4}$ Volumen Wasser, läßt absetzen und hebt die Ätherlösung ab. Der Äther wird abdestilliert und mit dem Rückstand werden die Reaktionen ausgeführt. Der Rückstand gibt die Ferrichloridreaktion, wird mit konz. Sodalösung blau, dann violett, mit Schwefelsäure orangefarben, bei Wasserzusatz rot.

Wo eine Trennung der Gewebe auf mechanischem Wege möglich ist, wird die Reaktion zur Lokalisationsermittelung dienen können.

Ferulasäure

Ferulasäure (Methoxykaffeesäure) bildet farblose, bei 169° schmelzende Nadeln und findet sich in verschiedenen Harzen (Asa foetida, Barth und Hlasiwetz, 1866, im Überwallungsharz von Pinus laricio, Bamberger, Umbelliferenopopanax, Tschirch und Knitl, 1899).

Der mikrochemische Nachweis gelingt einwandfrei mittels Mikrosublimation (Tunmann[2]). Sublimate erhält man bereits mit 0,05 g Asantharz oder mit 0,5 g weingeistiger Tinktur. Auch Präparate von Ferula narthex Boissier, die Sekretbehälter enthalten, geben reichliche Sublimate (Fig. 73). Das Harz (Droge) muß zuvor fein zerrieben werden. Bei der Sublimation entwickelt sich ein kräftiger Geruch nach gebratenen Zwiebeln. Das Sublimationsfeld erscheint rein weiß und von mattem wachsartigen Aussehen. Nur bei zu hoch gesteigerter Temperatur und bei zu langer Sublimationsdauer finden sich außerdem braune Massen und ölige Tropfen. Die sublimierten Kristalle zeigen verschiedene Formen, deren Entstehung abhängig ist von der Menge der vorhandenen Substanz, von der bei der Sublimation angewandten Temperatur und von der mehr oder weniger schnellen Kristallisation. Sehr geringe Mengen liefern einen kleinkörnigen Belag. Bei mehr Substanz (einige Zentigramm) bilden sich zunächst kurze Nadeln, dann etwas längere Kristalle, die an einem Ende etwas breiter sind und die sich schließlich zu Rosetten, Garben und strauchartigen Gebilden vereinigen. Außerdem erfolgt Bildung von bis zu 9 μ breiten Stäbchen, an deren Enden sich kleinere Kristalle pinsel- und strauchartig ansetzen (Fig. 73). Die bei mikroskopischer Betrachtung farblosen Kristalle lösen sich in heißem Wasser, in Weingeist, Äther, Schwefelsäure (mit

[1]) Ch. Charaux, Sur l'acide chlorogénique, Journ. de Pharm. et de Chim. 1910, 7 sér. II, S. 292.

[2]) Tunmann, Beitr. z. angew. Pflanzenmikrochemie, Der mikrochem. Nachw. d. Asa foetida, Gehe Berichte, 1911, S. 160.

gelber Farbe) und geben mit Ferrichlorid dunkelbraune schmierige Massen. Mit einem Tropfen wässeriger Kaliumpermanganatlösung versetzt, entwickelt das Sublimat kräftigen Vanillingeruch. Von Phloroglucinsalzsäure werden die Kristalle sofort mit tiefroter Farbe gelöst.

Vorhandene Spuren von Vanillin können leicht entfernt werden, wenn man das Sublimat einige Zeit auf einer erwärmten (30—40°) Asbestplatte liegen läßt.

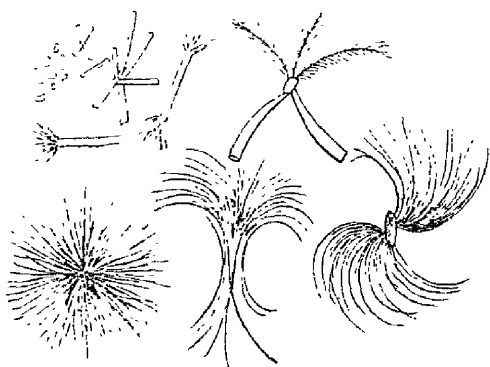



Fig. 73. Ferula narthex, Kristalltypen von Ferulasäure im Sublimat eines Tropfen Sekretes (Tunmann)

Ferulasäure wird in den Ferulaarten ausschließlich im Milchsaft der schizogenen Gänge gebildet. Beim Trocknen der Pflanzen imprägniert sie aber die Wände der sezernierenden Zellen, bisweilen auch des Markes und täuscht derart verholzte Gewebe vor. Diese durch Phloroglucinsalzsäure hier vorgetäuschte Ligninreaktion bleibt bei wiederholt mit Weingeist behandelten Präparaten aus. Wahrscheinlich kommt Ferulasäure häufiger in pflanzlichen Sekreten vor und verursacht die oft erwähnte „Verholzung" der Sezernierungszellen. Legt man die gefärbten Schnitte auf einige Tage in Glyzerin, dann ist die Holzfärbung stark abgeblaßt, während die Tropfen der Ferulasäure in den Gängen und die mit der Säure imprägnierten Membranen ihre leuchtend rote Farbe behalten und selbst nach Wochen nicht verlieren[1]).

Umbelliferon

Umbelliferon (4-Oxycumarin) bildet farblose, bei 225° schmelzende Prismen und findet sich in verschiedenen Harzen (Sagapen, Galbanum). Es entsteht bei der trockenen Destillation von Galbanum und des weingeistigen Auszuges von Daphne mezereum. Sein Methyläther ist das Herniarin (Herniaria hirsuta).

Umbelliferon läßt sich mikrochemisch leicht durch Sublimation nachweisen (Tunmann). 1—2 mg Sagapenharz oder Galbanumharz (Drogen) oder einige Sekret führende Schnitte von Ferula galbaniflua (Längsschnitte des Stengels) auf der Asbestplatte bei 5 cm hoher Spiritusflamme erhitzt, geben nach 3 Minuten 6—10 starke, rein kristallinische Sublimate von Umbelliferon. Die Rezipienten (Objektträger) dürfen nicht zu schnell gewechselt werden. Die ersten Sublimate bestehen nur aus Körnchen, die folgenden aus kurzen Stäbchen, die letzten aus bis 20—30 μ langen Nadeln und Prismen. Die Kristalle liegen einzeln, charakteristische Figuren fehlen. Die Kristalle scheiden sich sofort aus,

[1]) O. Tunmann, Über Ferula Narthex Boissier, insbesondere über die Sekretgänge dieser Pflanze, Ber. deutsch. bot. Ges., 1912, XXX, S. 245.

lösen sich leicht in Weingeist, Chloralhydrat, Anilin und Äther, schwer in Wasser. Sie lösen sich leicht in heißem Wasser, um sich beim Erkalten am Rande des Tropfens sofort in bis 80 μ langen Prismen abzuscheiden (Fig. 74). Außerdem erscheinen in der wässerigen Lösung schaumige, ölartige Tropfen. Das Sublimat ist demnach trotz seiner äußerlich reinen Beschaffenheit nicht einheitlicher Natur. Typisch ist die blaue Fluoreszenz der Lösungen (auch der Chloralhydrat-, nicht der Anilinlösung), die mikroskopisch am Rande des Tropfens gut zu sehen ist. Makroskopisch ist die blaue Farbe beim Halten des Objektträgers über eine schwarze Unterlage sichtbar.

Fig. 74. Umbelliferonnachweis; *a*) Sublimat von Ferula galbaniflua (sekrethaltiger Längsschnitt); *b*) mit Wasser, *c*) mit Chloralhydrat umkristallisiert; *d*) Sublimat des Sagapenharzes (Tunmann)

Der Umbelliferonnachweis gelingt ferner bei Daphne mezereum mit 0,05 g Pulver, wenn man dieses mit Weingeist auf dem Objektträger auszieht, das Extrakt abschleppt und nach vorsichtigem Eintrocknen sublimiert. Wahrscheinlich wird auch das Herniarin durch Sublimation nachweisbar sein.

Indol und Skatol

Indol (α-β-Benzopyrrol), in reinem Zustande farblose Blättchen F. 52° bildend, löst sich schwer in kaltem, leichter in heißem Wasser, leicht in Weingeist und Äther und ist mit Wasserdämpfen flüchtig. Es findet sich in geringer Menge im ätherischen Öle verschiedener Blüten (Jasminum, Cytisus, Coffea- und Citrus-Arten, Murraya exotica, Caladium), auch im Champignon[1]). Skatol (Methylindol) bildet ebenfalls weiße, mit Wasserdämpfen flüchtige Blättchen, die sich im Wasser schwer lösen; es ist in Nectandra-Arten und Celtis reticulosa (Stammholz 0,01%) aufgefunden worden.

Zum Nachweis von Indol läßt sich Oxalsäure benutzen. Wird Oxalsäure mit Indol geschmolzen, dann entsteht ein rotes Produkt, selbst bei Zimmertemperatur färben Indoldämpfe eine konzentrierte Oxalsäurelösung rosenrot. Diese Indolreaktion wird mit lebenden Jasmin- und Goldregenblüten in folgender Weise angestellt: Man bringt in einen Glastrichter einen mit konzentrierter wässeriger Oxalsäurelösung getränkten Bausch von Watte oder Glaswolle, bedeckt diesen

[1]) Im Champignon ist Indol auf den Gehalt des Bodens an Pferdedünger und Pferdeharn zurückzuführen, auf Stoffe, die reich an Indikan sind. Ein wässeriger Auszug von Champignon vorsichtig mit Schwefelsäure überschichtet, gibt an der Berührungszone einen violetten Ring (Indikan, M. Löwy, Der Champignon, eine indolbildende Pflanze, Chem.-Ztg., 1910, XXXIV, S. 340).

mit *einer kleinen Glasplatte* und legt eine eben aufgebrochene Jasminblüte darauf. Der Bausch färbt sich durch die Indoldämpfe innerhalb 25 Minuten rosa, nach längerer Zeit violett. Bringt man ferner den Oxalsäurebausch, sei es in einer Kristallisierschale, sei es in einem Glastrichter über eine Blüte, dann wird letztere gefärbt und die entstandenen Farben lassen sich mikroskopisch an Präparaten erkennen[1]).

Weehuizen[2]) weist Indol im weingeistigen Auszug der zerquetschten Blumenblätter nach mit einer 1proz. Lösung von Vanillin oder Paradimethylamidobenzaldehyd in einer Mischung gleicher Teile Weingeist und starker Salzsäure. Bei gefärbten Blüten oder bei solchen, die sich beim Zerquetschen bräunen (Coffea), ist es vorteilhafter, die Blüten in ein Glasgefäß zu geben und an dem Deckel einen Streifen Filtrierpapier zu befestigen, das mit den erwähnten Reagentien (Oxalsäure, Vanillin oder Paradimethylamidobenzaldehyd) durchtränkt ist. Derart fand Sack[3]) Indol in den Blumendüften von Citrus- und Coffeaarten, Baccarini[4]) in zahlreichen Monocotylen-Blüten und in den vegetativen Teilen von Myrtus und Tilia. Die Prüfung mit Oxalsäure ist am sichersten, doch müssen alle Reaktionen ausgeführt werden und nur bei gleichen Ergebnissen darf auf die Anwesenheit von Indol geschlossen werden.

Die Prüfung auf Skatol fällt zum Teil in das Gebiet der Makrochemie. Man versetzt das aus dem zerstoßenen Pflanzenmaterial mit Wasserdampf erhaltene Destillat mit einer Lösung von 5% Vanillin in 96proz. Weingeist und einigen Tropfen starker Salzsäure. Es tritt rotviolette Färbung ein, die bei Zusatz einiger Tropfen einer 0,5proz. Natriumnitritlösung in Blauviolett übergeht. Oxalsäure-Watte wird durch Skatol nicht gefärbt. Zur Lokalisation im Gewebe kann eine ätherische Pikrinsäurelösung benutzt werden, sowie eine 2proz. Lösung von Glykose in starker Salzsäure. Die eintretenden Farbenreaktionen zeigen Skatol in den eiweißhaltigen Zellen des Holzes an (Markstrahlen, Parenchym). — Bei größeren Mengen dürfte möglichweise die Sublimation angefeuchteter Schnitte zum Ziele führen.

[1]) E. Verschaffelt, Réact. q. permett. décéler l'indol d. l. parf. d. fleurs, Rec. d. trav. bot. Néerl., 1904, I, S. 120.

[2]) F. Weehuizen, Über indoloide Düfte, Rec. d. trav. bot. Néerl., 1911, VIII, S. 97.

[3]) J. Sack, Einige phytochemische Mitteilungen, Pharm. Weekbl., 1911, XLVIII, Nr. 13.

[4]) P. Baccarini, Sopra la presenza di Indolo nei fiori di alcune piante, Bull. Soc. bot. ital., 1910, S. 96 u. 1911, S. 105.

Juglon

Juglon (Nucin, Regianin, Oxy-α-Naphthochinon), von Vogel und Reischauer 1856 entdeckt, bildet gelb- bis braunrote lange Nadeln F. 150°, kaum löslich in Wasser, und kommt neben α- und β-Hydrojuglon in den noch grünen Schalen der Früchte und in allen jugendlichen Organen von Juglans regia vor. Es ist nicht ausgeschlossen, daß glykosidische Körper vorliegen. Nach Tunmann[1]) häufen sich die Juglone im Wundgewebe an (Wundschutzpigmente). Bei weiterer Entwicklung verschwinden sie, zuerst im Innern der Gewebe, zuletzt in den subepidermalen Partien.

Zum mikrochemischen Nachweis benutzte Hermann[2]) Ammoniakdämpfe; die entstehende purpurrote Färbung zeigt Juglon an. Die Färbung wird nach einiger Zeit braun. Die besten Erfolge erzielt man nach Tunmann mit einer wässerigen Lösung von Kupferazetat (1 : 10). In kurzer Zeit entstehen in den Zellen bis 20 μ lange Kristallnadeln, die sich zu fast schwarzen Drusen vereinigen. Der Schnitt wird in wässeriges Chloralhydrat gelegt (nicht durchsaugen oder erwärmen). Die Drusen erscheinen karmoisinrot, der Schnitt ist gut aufgehellt. Mit weingeistigem Kupferazetat bildet sich Juglonkupfer außerhalb der Zellen (am Deckglasrande bis 200 μ große schwarzbraune Kristallgruppen). Dämpfe von Salpetersäure erzeugen kugelige Gebilde von schwarzer Farbe und kristallinischer Natur (Juglonsäure?). Anilin bewirkt am Deckglasrande bis 300 μ große braunrote Kristallgruppen, die hellrot polarisieren, Bromwasser braungelbe Kristalle. Bei frischem Material entstehen außerhalb des Gewebes Juglonkristalle (kurze tiefgelbe Nadeln) beim Einlegen in Wasser (am besten kalkhaltiges Leitungswasser), bei Glyzerin- oder Weingeistzusatz, selbst beim Eintrocknen eines etwas zerquetschten Schnittes[3]). Die farblosen Zellen führen

Fig. 75. Juglonnachweis in Juglans regia. *a*) Parenchym des mittleren Exocarps, bei Wasserzusatz gelbe Juglonkristalle; *b*) ein eingetrockneter Tropfen des Sublimates mit Juglonkristallen; *c*) Kristalle von Juglonkupfer; *d*) aus Anilin abgeschiedene rotbraune Kristalle (Tunmann)

[1]) O. Tunmann, Über den mikrochemischen Nachweis und die Lokalisation der Juglone in Juglans regia, Pharm. Zentralh., 1912, LIII, S. 1005.

[2]) O. Herrmann, Nachweis einiger organischer Verbindungen in den vegetabilischen Geweben, Dissertation Leipzig 1876, S. 27.

[3]) Die Plasmolyse hat auch R. Chemineau benutzt (Rech. microchim. sur quelques glucosides, Tours 1904, S. 61).

α-Hydrojuglon, die gelben Juglon. Die farblosen Zellen werden beim Liegen (trocken unter Deckglas) bald gelb, α-Hydrojuglon geht in Juglon über. Bei der Sublimation liefert 1 mg 2—3 starke Sublimate von Juglonkristallen. Bei ganz frischem Material bilden sich schon im Anfange der Sublimation zeisiggelbe α-Hydrojuglonkristalle, bei einige Zeit gelagertem Material und höherer Temperatur rötliche Juglonkristalle. Erstere gehen beim Liegen in Juglon über. Die Kristalle lösen sich in Weingeist, Chloroform, Anilin, langsam in Äther und Petroläther, tiefrot in Schwefelsäure, violettblau in Ammoniak; konzentrierte Kalilauge färbt fast schwarz, löst wenig, verdünnte Kalilauge löst sofort rötlich (vgl. Fig. 75).

Ein in seinem Verhalten mit dem Juglon übereinstimmender Stoff wurde von Fünfstück und Braun[1]) aus Wurzeln und Blattstielen von Drosera binata und Dionaea muscipula erhalten. Seine gelben — auch durch Mikrosublimation erhältlichen — Nadeln treten in den Schnitten entweder alsbald oder nach teilweisem Verdunsten des Wassers auf. Dieterle[2]) hat dann festgestellt, daß es sich dabei um ein von Juglon verschiedenes Oxynaphthochinon handelt. Derselbe oder ein nahestehender Stoff kommt auch in Drosera rotundifolia vor (van Ketel, Sabalitschka)[3]).

Lapachol

Das Lapachol, ein Oxyamylen-naphthochinon, kommt, meist begleitet von anderen kristallinischen Substanzen in mehreren Hölzern vor, so im Lapacho- oder Taigu-Holz von südamerikanischen Tecoma-Arten, in den Ipé-Hölzern, sowie im Ipé-tabaco-Holz von Tecoma chrysotricha Mart. u. a., im ostindischen von einer Illipe-Art stammenden Edelteak- oder Moah-Holz, in dem westafrikanischen, wahrscheinlich auch von einer Tecoma - Art abstammenden Beth-a-barra-Holz und in dem Holze von Avicennia tomentosa (Ost- und Westindien, Westafrika). Dagegen enthält das Greenhart-Holz von Nectandra Rodiaei entgegen der Angabe von Stein kein Lapachol (Oesterle), wohl aber das Greenhart-Holz von Bignonia leucoxylon.

Lapachol kristallisiert in gelben an den Ecken abgeschnittenen Täfelchen (F. 140°). Fast unlöslich in Wasser, löslich in Äther, Benzol, Weingeist, schwerer in Petroläther; in Ammoniak, kohlensauren und Ätz-Alkalien leicht mit roter Farbe löslich. Silbersalz tiefrot, Quecksilbersalz gelb, Bleisalz ziegelrot, Eisensalz braun, Antimonsalz orangefarbig.

[1]) M. Fünfstück u. R. Braun, Zur Mikrochemie der Droseraceen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1916, XXXIV, S. 160.

[2]) H. Dieterle, Über Drosera binata, Arch. Pharmazie, 1922, CCLX, S. 45.

[3]) Th. Sabalitschka, Über Drosera rotundifolia L., Arch. Pharmazie, 1923, CCLXI, S. 217.

Tunmann[1]) isolierte das Lapachol durch Sublimation und Kristallisation unter Deckglas und ermittelte die Lokalisation durch Ammoniakdampf.

Durch Sublimation kleiner Schnitte oder Schnippsel lapacholhaltiger Hölzer erhält man hellgelbe Sublimate mit chromgelben flachen monoklinen Prismen oder Täfelchen (Fig. 76,1), sie leuchten im polarisierten Licht lebhaft in allen Farben, besitzen teils gerade, teils schiefe Auslöschung und sind stark pleochroitisch (bis zur Farblosigkeit). Dazwischen finden sich größere oder kleinere Haufen kleinerer Kriställchen, meist Zerrformen, sowie glänzende gelbe Tropfen, in denen sich

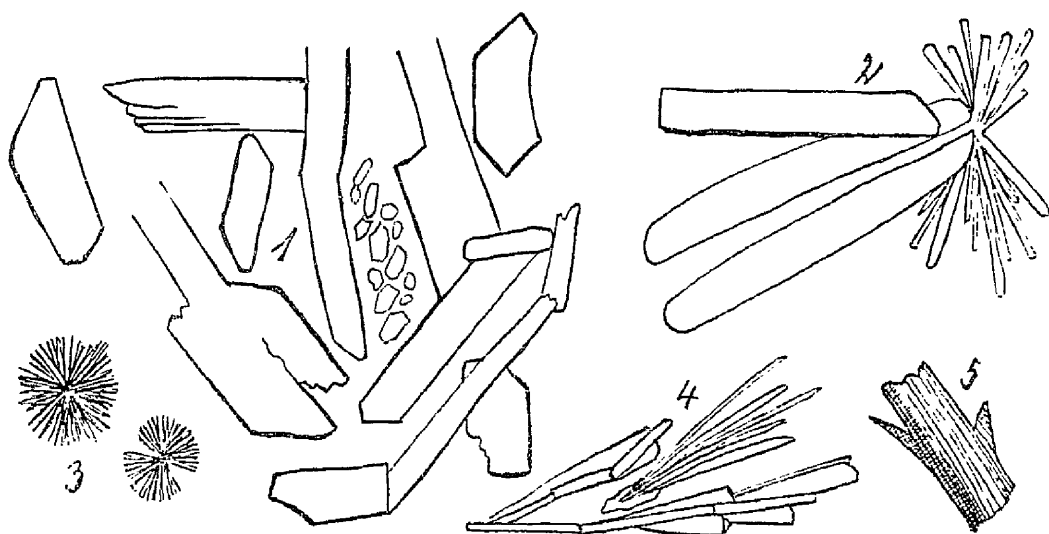



Fig. 76. 1. Lapacholkristalle in dem unmittelbar aus den Hölzern gewonnenen Sublimate. 2. Aus Lapachol mit Schwefelsäure [illegible]le. 3. Lapacholsaures Kupfer, am Objektträger mit Kupferazetat erhalten. [illegible] aus Schnitten unter Deckglas abgeschiedene Lapacholkristalle. 5. In den Gefäßen der Hölzer abgeschiedene Kristalle von Roh-Lapachol (Tunmann)

bald flache, strahlig angeordnete Prismen abscheiden; sie stehen mit ihren Schmalseiten auf dem Objektträger und täuschen dadurch Nadeln vor.

Mit weingeistiger Kupferazetatlösung erhält man nach dem Eintrocknen violette Kristallkrusten, die bei gekreuzten Nicols rot leuchten (Kupferazetat blau). Löst man das Sublimat unter Vermeidung eines Überschusses in wässerigem Ammoniak, dann geben die kleinen Kristalle eine rote Lösung, die großen gehen sofort in drusenförmig angeordnete dunkelrote, fast schwarze Nadeln (Fig. 76,3) über, die im polarisierten Licht kupferfarbig erscheinen.

Übergießt man das Sublimat mit weingeistiger Kali- oder Natronlauge, so erhält man nach dem Eintrocknen zuerst rote Tropfen, dann

[1]) O. Tunmann, Der mikrochemische Nachweis des Lapachols, Apoth. Ztg., 1915, XXX, S. 50.

rote Kristallrasen, und zuweilen rote Täfelchen. Alle diese Kristalle leuchten im polarisierten Licht rot oder braunrot.

Befeuchtet man Schnitte lapacholhaltiger Hölzer unter Deckglas mit Chloroform oder Essigäther, so erhält man bald Lapacholkristalle, teils als lange, flache Kristallbalken und -blättchen, teils als Kristallrasen.

Setzt man die Schnitte 1—2 Stunden in Ammoniakdampf, dann werden alle lapacholhaltigen Elemente tief kirschrot. Beobachtung in Öl. Das Lapachol tritt nur in den Gefäßen auf; die Libriformfasern sind vollkommen frei davon. In der lebenden Pflanze ist das Lapachol im Saftstrom der Gefäße gelöst. Werden die Gefäße bei weiterem Dickenwachstum außer Betrieb gesetzt, dann scheiden sich die Lapacholmassen, zum Teil in kristallisierter Form, ab.

Lapachonon[1])

Begleitet das Lapachol im Edelteak- und Lapachoholz. Weiße perlmutterglänzende Blättchen (F. 61,5°), löslich in Weingeist, Äther, Petroleumbenzin, Chloroform, Benzol und Eisessig. Gibt mit Pikrinsäure ein violettes Additionsprodukt (F. 153°). Mit konzentrierter Schwefelsäure indigoblaue Färbung.

Die Kristalle des Lapachonons sind sowohl im Edelteak-, als im Lapachoholz in den Gefäßen abgeschieden.

Vanillin

Vanillin (der Monomethyläther des Protokatechualdehyds), der wohlriechende Bestandteil der Vanille, steht chemisch und wohl auch genetisch in Zusammenhang mit dem Koniferylalkohol durch dessen Oxydation es sich bildet und dem Vanillylalkohol, aus dessen in unreifen Vanillefrüchten vorkommendem Glykosid es durch Oxydation und Hydrolyse hervorgeht. Auch ein Vanillinglykosid ist in den unreifen Vanillefrüchten nachgewiesen worden und kommt auch in Samenschale und Wurzel von Triticum repens vor. Die Spaltung bewirken Enzyme; sie erfolgt bei den Vanilleschoten durch Fermentation und kann künstlich durch Nekrobiose hervorgerufen werden (Kälte, Äther, Chloroform, Ed. Heckel, Compt. rend. 1910, CLI, S. 128).

In kleinen Mengen ist Vanillin eine weitverbreitete Substanz. Vanillin wird angegeben für Nigritella suaveolens (Blüten), Lupinus albus (Samen) und Ilex-Arten, sowie u. a. für die Orchidee Gymnadenia albida (v. Lippmann, Ber. chem. Ges., 1912, S. 3431); auch in Spargel-

[1]) H. Matthes u. E. Schreiber, Über hautreizende Hölzer, Ber. deutsch. pharmaz. Ges., 1914, XXIV, S. 385.

sprossen, Kartoffelschalen, bei der Verarbeitung verkorkter und verholzter Membranen, in harzigen Sekreten (Asa foetida, Sumatra- und Siambenzoe, Peru- und Tolubalsam) ist Vanillin gefunden worden. — Physiologische Erfahrungen liegen nicht vor.

Vanillin bildet Nadeln (F. 81°), leicht sublimierbar, schwer mit Wasserdämpfen flüchtig. Löslich in etwa 80 Teilen kaltem Wasser, leichter in Weingeist u. dgl. Empfindlich sind die Farbenreaktionen, die Vanillin bei Gegenwart von Salzsäure oder Schwefelsäure mit Phenolen gibt, so die Rotfärbung mit Phlorogluzin, Orzin und Resorzin. Mit 0,5 mg Vanillin tritt noch in einer wässerigen Vanillinlösung (in stärkerer Konzentration nach Verschwinden der zunächst entstehenden Blaufärbung) mit Ferrichlorid die Bildung des unlöslichen Dehydrodivanillins ein. Die Farbenreaktionen mit Phlorogluzin usw. sind von Molisch u. a. zu Lokalisationsstudien benutzt worden; sie haben für diesen Zweck nur Wert, wenn andere sich ebenso verhaltende Stoffe — es gibt deren manche — ausgeschlossen sind. Dasselbe gilt für die mit Millons Reagens in den Vanillinzellen eintretende Violettfärbung.

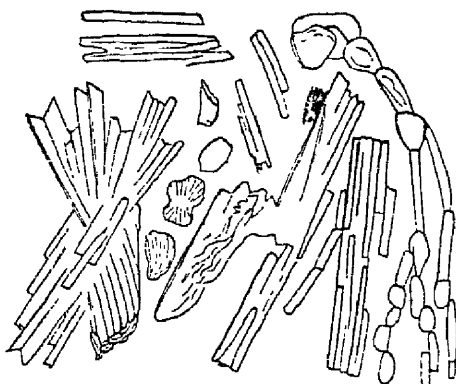



Fig. 77. Vanilla planifolia (Frucht), Vanillin im Sublimat (Tunmann)

In der Vanille kommt das Vanillin und seine Muttersubstanzen (s. oben) nur im Parenchym vor, wird aber bei der Fermentation auch von der Membran gespeichert. Das Sekret der Papillen ist vanillinfrei.

Zum Nachweis in Vanille empfiehlt sich die Mikrosublimation.

Einige sehr kleine Fragmente der Vanillefrucht oder ein wenig Pulver genügen zur Sublimation[1]); in 1/4 Stunde ist bei sehr kleiner Flamme ein deutlicher Beschlag kleiner Tröpfchen vorhanden, nach 1 Stunde (nach dem Entfernen des Objektes von der Flamme) erfolgt Kristallbildung. Relativ selten wird man gut entwickelte, einzeln liegende Prismen antreffen. Überwiegend findet man lamellenartige Kristallmassen und Klumpen und Schollen von zum Teil faseriger Struktur (Fig. 77). Sämtliche Ausscheidungen, auch die eingetrockneten „Tröpfchen", leuchten im polarisierten Lichte in allen Farben lebhaft auf, die Auslöschung ist schief.

Zum Nachweis des Vanillins in den Sublimaten kann man zwar die Farbenreaktionen heranziehen. Charakteristischer sind folgende Reak-

[1]) A. Nestler, Der direkte Nachweis des Cumarins und Theins durch Sublimation, Ber. deutsch. bot. Ges., 1901, XIX, S. 361.

tionen: Mit konzentrierter weingeistiger Kali- oder Natronlauge entstehen Büschel feiner Nadeln, mit m-Phenylendiamin und Salzsäure gelbe, mit p-Phenylendiamin und Salzsäure orange Nadelbüschel. Auch die mit m-Nitrobenzhydrazid (2proz. wässerige Lösung) entstehende sehr schwer lösliche Fällung dürfte sich verwenden lassen.

Bringt man zu einem Tropfen Vanadylphosphatlösung, Lösung von Vanadinsäure in Phosphorsäure 1 : 4, auf einem Objektträger einen Vanillinkristall, so erscheinen allmählich in der Flüssigkeit und noch mehr auf dem Kristall selbst zierliche rotbraune Nädelchen, die sich zu Sternchen und Büscheln vereinigen. Bringt man in die Höhlung eines ausgehöhlten Objektträgers verdünnte Phosphorsäure (1:5), einige Körnchen „unlösliche Vanadinsäure“ und ein paar Vanillinkristalle, so erscheinen auf diesen und um sie herum anfangs vereinzelt, dann in größerer Menge rotbraune Sphärite und Doppelsphärite des „Vanillanins“[1]).

Sekrete

Unter Sekreten versteht man Stoffe, die die Pflanze in besonderen Zellen erzeugt („sezerniert“) und entweder in ihnen oder benachbarten Gängen, Kanälen u. dgl. bewahrt.

Nach Ossowski[2]) werden die Sekrete in besonderen Körperchen (Exkreto-Sekretogene) erzeugt, die Protein und Kohlenhydrate (vielleicht Glukoproteide) enthalten. Die Körperchen sind widerstandsfähig gegen Schwefelsäure, Salzsäure und Salpetersäure. Ausnahmen: Jambosa caryophyllus (empfindlich gegen Salpetersäure), Pinus silvestris (empfindlich gegen längere Einwirkung von Schwefelsäure). Weingeist, kaltes und heißes Wasser verändern die Körperchen nicht; 10proz. Kalilauge ruft geringe Quellung hervor und bildet in einigen Fällen Kristalle. Die Körperchen sind kugelig, oval oder stäbchenförmig; einige erinnern an Elaioplaste.

Als Assimilations- oder Autoplastensekret (Grana nach Schimper 1885) bezeichnet A. Meyer[3]) ein schon von Nägeli beobachtetes in den Autoplasten auftretendes oder aus ihnen austretendes Sekret. Das Sekret entsteht in den Autoplasten während der Assimilation der Kohlensäure in Form von Tröpfchen. Man findet sie allgemein bei Angiospermen, Gymnospermen, Pteridophyten und Bryo-

---

[1]) J. Grüß, Ber. deutsch. bot. Ges., 1920, XXXVIII, S. 361.

[2]) A. Ossowski, Studium über die Entstehung der ätherischen Öle, Balsame und Harze, Roczniki Farmacje, 1927, V, S. 1 nach Bot. Centralbl., 1929, N. F. XIII, S. 403.

[3]) A. Meyer, Morphologische und physiologische Analyse der Zellen usw. S. 313ff. — Derselbe, Das Assimilationssekret von Vaucheria terrestris, Ber. deutsch. bot. Ges., 1918, XXXVI, S. 235; Derselbe, Die angebliche Fettspeicherung immergrüner Laubblätter, ebenda S. 5.

phyten (mit Ausnahme von Anthoceros). Auch bei den Grünalgen scheinen sie aufzutreten.

Zum Nachweis des Sekrets behandelt man erst mit 2proz. Osmiumsäure und dann mit Chloralhydrat (gleiche Teile Chloralhydratlösung 2+5 und Wasser). Auch mit einem Gemisch von Eisessig + 15% Wasser tritt das mit Osmiumsäure behandelte Sekret hervor, da es nur langsam gelöst wird. Eisessig und Äther lösen es; ammoniakalische Kalilauge bewirkt keine Verseifung. Durch Erhitzen auf 120° verschwindet das Sekret allmählich. Das Assimilationssekret ist ein Gemisch, in dem wahrscheinlich der α, β-Hexylenaldehyd (Curtius und Franzen) vertreten ist; Fett fehlt.

Als Mesekret bezeichnet A. Meyer „Öltropfen, welche sich frei im Zytoplasma der Mesophyllzellen abgelagert finden, sich in viel Alkohol und in Chloroform ganz oder größtenteils lösen, mit Osmiumsäure bräunen, fast ganz oder ganz flüchtig sind, für uns keinen auffallenden Duft und Geschmack haben und in den jungen Blättern noch weniger entwickelt sind, als in älteren". Es ist bei vielen Angiospermen und Gymnospermen gefunden worden und scheint am häufigsten in den Blättern der Immergrünen vorzukommen. Die Mesekrettropfen liegen im wandständigen Protoplasma. Das Mesekret hat wohl kaum in allen Fällen dieselbe Zusammensetzung. Sein mikrochemisches Verhalten ist nach A. Meyer etwa das folgende: Chloroform und Äther lösen leicht, 95proz. Weingeist löst schwer, Eisessig unvollständig. Osmiumsäure bräunt. Mit Kalilauge-Ammoniak keine Verseifung; beim Erhitzen auf 130° verflüchtigt es sich zum größten Teil. Wird von konzentrierter Schwefelsäure nicht angegriffen. Allgemeines Verhalten das der Lipoide.

Kleine Tropfen des Sekretes von Ilex aquifolium werden nach Bloch von Kali-Ammoniak anscheinend gelöst, ohne Seifenkristalle zu hinterlassen, größere Tropfen werden kaum angegriffen. (R. Bloch, Über das Mesekret von Ilex aquifolium, Ber. deutsch. bot. Ges. 1924, XLIII, S. 235.

Nach Guilliermond u. Mangenot[1]) erscheinen die Ölkügelchen des Meyerschen Autoplasten-Sekrets in den jungen Zellen, werden resorbiert, wenn die Plastiden Stärke und Pigmente bilden und erscheinen wieder, wenn die Plastiden degenerieren. Es handelt sich wahrscheinlich um eine Mischung von Lipoiden und Neutralfetten.

Das Meyersche Mesekret erscheint nicht nur in den Zellen des Mesophylls, sondern in allen Zellen und zwar im Plasma. Es bestehe entweder aus Neutralfett oder Lipoiden oder einem Gemisch beider.

[1]) A. Guilliermond u. H. Mangenot, Sur l'„Autoplastensekret" et le „Mesekret" d'Arthur Meyer, Compt. rend. soc. biol., 1923, LXXXIX, S. 240.

„Die Sekretante liegen meist als große, homogene, stark lichtbrechende von der Hüllmembran umschlossene Einzeltropfen in der fertigen Sekretzelle, welche sie zuletzt fast ganz erfüllen und bestehen meist aus Gemischen flüchtiger Substanzen. Doch kommen auch in einigen wenigen Fällen Sekretante vor, welche Emulsionen wasserunlöslicher in Wasser suspendierter Tröpfchen sind, also sich den Milchsäften nähern. Die Sekrettropfen sind durch die Zellmembran mit der Suberinlamelle und der Hüllmembran, wie es scheint, sehr gut gegen das Verdampfen geschützt, die Sekretstoffe werden aber doch bei längerem Kochen mit Wasser aus der Membran herausgelassen." (A. Meyer)[1]. In den Sekretzellen ausgewachsener Blätter von Laurus nobilis war in den spärlichen Protoplastenresten ein gut erhaltener Kern nirgends zu erkennen (Derselbe).

Die überwiegende Menge der Sekrete gehört zu den ätherischen Ölen und Harzen.

Es ist erwiesen, daß jene Körper, die wir als ölig-harzige Sekrete zusammenfassen und im mikroskopischen Bilde sehen, nur in den Sekretbehältern selbst lokalisiert sind. Nachdem Hanstein[2]) die Vermutung ausgesprochen hatte, daß die ätherischen Öle und Harze erst im Sekretraum gebildet werden aus „in chemisch anderer Gestalt hierher gewanderten" Substanzen, sagt de Bary[3]), „daß das Sekret, zunächst das harzige in der Wand (des Sekretraumes) selbst abgeschieden wird und auch dort entsteht" und A. Meyer[4]) vertritt bei den schizogenen Gängen die gleiche Ansicht. Nach Tschirch bildet sich das Sekret ohne Beteiligung des Plasmas, in einer zur Membran der sezernierenden Zellen gehörenden Schleimschicht in der resinogenen Schicht.

Diese Ansicht ist von keinem neueren Untersucher bestätigt worden und muß als widerlegt gelten (Näheres darüber s. im Abschnitt „Über die sog. resinogene Schicht").

Für die Entstehung des Sekretes in den Sekretzellen von Persea indica macht A. Leemann[5]) unter Ablehnung der Tschirchschen Ansichten folgende Angaben:

Die Sekretzellen setzen frühzeitig in der Mitte der äußeren periklinen Wand einen sog. Initialtropfen an, der aus Phosphatiden besteht und

[1]) A. Meyer, Die morphologische und physiologische Analyse der Zelle usw., S. 341 ff.

[2]) J. Hanstein, Über die Organe der Harz- und Schleimabsonderung in den Laubknospen, Bot. Ztg., 1868, XXVI, S. 777.

[3]) A. de Bary, Vgl. Anatomie der Vegetationsorgane, 1877, S. 98.

[4]) A. Meyer, Über die Entstehung der Scheidewände in dem sekretführenden plasmafreien Interzellularraume der Vittae der Umbelliferen, Bot. Ztg., 1889, XLVII, S. 341.

[5]) A. Leemann, Das Problem der Sekretzellen, Planta 1928, VI, S. 216.

durch Zuzug neuer Phosphatide aus dem Plasma langsam größer wird. Nach einer gewissen Zeit differenziert sich der Initialtropfen in zwei Teile: 1. in eine der Membran anhaftende Kupula; 2. in einen membranogenen Tropfen, der dem ätherischen Öl als Membran dienen soll. Von einem gewissen Moment an beginnt im Protoplasma die Ölbildung. Es bildet sich vorerst das Rohmaterial, das auch in späteren Stadien in den Initialtropfen sich ergießt. Später dringt auch fertiges ätherisches Öl in den membranogenen Tropfen.

Die Terpenbildung denkt sich Leemann folgendermaßen: Aus Aminosäuren, die durch Autolyse des Plasmas entstehen, entstehen durch unvollständige Desaminierung Aldehyde. l-Leuzin im besonderen gibt Isovaleraldehyd, welches durch Aldolisation zweier Moleküle sich zu einem aliphatischen Terpen umwandelt.

Schon vorher war Lehmann[1]) unter Ablehnung der Tschirschschen Lehre von der resinogenen Schicht zu der Auffassung gekommen, daß die Sekretzelle selbst die Herstellung und Abscheidung des Sekretes übernimmt und daß das Rohmaterial im Plasma anscheinend durch Umwandlung der Plasmasubstanz hergestellt wird. Die im Plasma während der Sekretbildung auftretenden Tröpfchen sind nicht mit dem fertigen Sekret identisch; dies kann also auch nicht durch deren Zusammenfließen entstehen, wie Müller, Tschirch und Biermann behaupten.

Der Harzbalsam auf den jungen Trieben einheimischer Pappeln tritt nach Fehér[2]) entweder direkt an der Außenfläche oder zwischen Kutikula und Zellmembran, nicht in den Sekretzellen selbst auf.

Ätherische Öle

Als ätherische Öle bezeichnet man die aus den Pflanzen erhältlichen flüssigen, flüchtigen und deshalb riechenden überwiegend wasserunlöslichen Bestandteile, gleichgültig, ob sie in der Pflanze bereits vorgebildet sind oder erst aus Glykosiden entstehen.

In einzelnen Fällen, so bei vielen Koniferen, bestehen die ätherischen Öle nur aus Kohlenwasserstoffen (Terpene, Sesquiterpene, Diterpene), meistens sind es aber Gemische aus diesen und anderen Stoffen (Alkohole, Phenole, Aldehyde, Ketone, Ester u. a.).

Die durch Destillation gewonnenen ätherischen Öle sind nicht immer durchaus identisch mit den ursprünglichen der Pflanze, da

[1]) C. Lehmann, Studien über den Bau und die Entwicklungsgeschichte von Ölzellen, Planta 1925, I, S. 343.

[2]) D. Fehér, Über die Abscheidung von Harzbalsam auf den jungen Trieben unserer einheimischen Populus-Arten, Beih. z. bot. Zentralbl., 1922, XXXIX, S. 81.

durch die Destillation Veränderungen eintreten können, z. B. Verseifung von Estern. Auch können mit den ätherischen Ölen Pflanzenbestandteile übergehen, die anderen Teilen der Pflanze als den Ölzellen und Ölbehältern entstammen.

Die isolierten ätherischen Öle erleiden durch Luft und Licht allmählich eine Veränderung in Farbe, Reaktion u. a., welche man als Verharzung bezeichnet. Dieser Vorgang, bei dem schließlich mehr oder weniger feste Körper (Balsame, Harze) zurückbleiben, erfolgt in der lebenden Pflanze, teils frühzeitig im Lebensprozeß (in den schizogenen Gängen der Koniferen u. a.), teils am Ende der Vegetation; so geht das ätherische Öl in den Menthadrüsen im Spätherbst in Balsam über und man trifft alsdann im lebenden Material subkutikular einen grüngelben, mehr oder weniger festen Ballen an.

Zu den Sekretbehältern, die ätherische Öle und Harze führen, zählen: die Epidermaldrüsen (Drüsenhaare, -flächen, drüsige Blattzähne, Zwischenwanddrüsen) interzellulare Drüsenhaare (Aspidium, Pogostemon, Dysophylla), Ölzellen (Zingiberaceen, Piperaceen, Lauraceen, Myristicaceen, Araceen, Magnoliaceen, Convolvulaceen, Liliaceen u. a.), schizogene Behälter und Gänge (Umbelliferen, Myrtaceen, Compositen, Koniferen, Guttiferen, Burseraceen, Dipterocarpaceen u. a.); fallen ganze Gewebekomplexe der „Verharzung“ anheim, so spricht man von Destruktionslücken (Agaricus, Xanthorrhoea).

Tschernuchin[1]) glaubt für das ätherische Öl des Korianders folgendes festgestellt zu haben. Zuerst werden Säuren synthetisiert, die dann in Aldehyde und vielleicht auch in Ketone CH_3 COR übergehen. Während dann die Säuren verschwinden, entstehen Alkohole und Kohlenwasserstoffe; es finden also Reduktionsprozesse statt, die aber durch sekundäre Vorgänge kompliziert werden, so durch Umgruppierungen, Ätherbildung und Dehydratation von Alkoholen mit Bildung ringförmiger Kohlenwasserstoffe. Das ätherische Öl der Sekretdrüsen von Labiaten und Kompositen ist ein Nebenprodukt des Wachstums, nicht des funktionellen Stoffwechsels (Klug)[2]).

Bei der Keimung des Anissamens bleibt das ätherische Öl nach Beschaffenheit und Menge unverändert (Iwanoff u. Grigorjewa)[3]).

Die ätherischen Öle erfahren während des Wachstums der Pflanze Veränderungen, die mit deren Entwicklung in direktem Zusammenhang stehen[4]).

[1]) A. Tschernuchin, Prozeß der Bildung des ätherischen Öls im Koriander nach Chem. Centralbl., 1929, II, 583.

[2]) J. Klug, Über die Sekretdrüsen bei den Labiaten und Kompositen, Diss. Frankfurt a. M., 1926.

[3]) N. J. Iwanoff u. W. F. Grigorjewa, Über die Unveränderlichkeit des ätherischen Öles beim Keimen der Anisfrüchte, Biochem. Zeitschr., 1929, CCII, S. 284.

[4]) V. Nylov, W. W. Williams u. L. A. Michelson, Die Veränderung der ätherischen Öle in den Pflanzen, Parfum. mod. 22, 567 nach Chem. Zentralbl., 1929, II, S. 2336.

Bei Mentha piperita nimmt der Menthol-Gehalt mit fortschreitender Entwicklung bis zur Blüte zu, während der Gehalt an Menthon gleichzeitig abnimmt (Rutowski u. Trawin)[1]).

Der mikrochemische Nachweis der ätherischen Öle ist mit einiger Sicherheit in jenen Fällen zu erbringen, in denen sich größere Mengen auf relativ kleinem Raum angehäuft finden wie im subkutikularen Raum der Epidermaldrüsen oder im Lumen der Ölzellen. Doch selbst in diesen Fällen muß man mit der Anschauung brechen, in dem „ätherischen Öle" einen Körper chemisch einheitlicher Zusammensetzung zu sehen oder jenes Produkt, das der Chemiker bei der Destillation aus der betreffenden Pflanze gewinnt. Die ätherischen Öle im Gewebe, resp. die Inhalte des Sekretraumes, bestehen nicht nur aus ätherischem Öle, wie man bis in die neueste Zeit meist annimmt. Es ist schon lange bekannt, daß im ätherischen Öle Alkaloide (Piperin), Laktone (Santonin), Farbstoffe (Chinone) und andere Körper lokalisiert sind. Diese Körper hat man bei der Diagnose berücksichtigt; wir finden jedoch häufig Fette, subkutikular bei vielen Compositendrüsen, Labiaten (Fig. 78) u. a. (Tunmann), in den schizogenen Gängen bei Koniferen (Gingko, Senft), Gerbstoffe (Orthosiphon, Salvia, Eriodictyon, Tunmann, Gardenia, Spermolepis, Heckel[2])), glykosidische Körper (Ölzellen, Exogonium purga), ferner bei Labiaten, Compositen, Umbelliferen und Koniferen und wohl auch anderwärts Magnesium, zuweilen Kalium. Nun sollte bei den Studien über die Entstehung und die Lokalisation der ätherischen Öle der Nachweis erbracht werden, ob die stark lichtbrechenden Gebilde in den Sezernierungszellen mit dem Öle des Sekretraumes chemisch übereinstimmen. Diese Fragestellung konnte überwiegend nur zu negativen Resultaten führen, eben weil im Sekretraum sehr oft Gemische vorliegen, in denen das ätherische Öl nicht einmal den Hauptbestandteil bildet. Zuweilen überwiegt Fett derart, daß es richtiger wäre, von

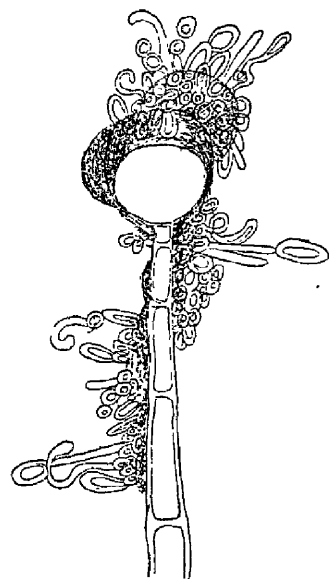



Fig. 78. Salvia glutinosa, Drüse vom Kelchrande. Grundmasse des Sekretes Fett (nicht Harz, ätherisches Öl nur in Spuren). Myelinformen mit konz. Kalilauge; man beachte, daß die Reaktion auch in dem spontan ausgeflossenen Sekrete auftritt

[1]) B. Rutowski u. A. Trawin, Über die Anreicherung von Menthol und Menthon im Pfefferminzöl während der Vegetation der Mentha piperita (Riechstoffind., IV, S. 124).

[2]) Heckel u. Schlagdenhauffen, Sur les rapports génétiques des matières résineuses et tanniques d'origine végétale, Compt. rend., 1892, CXIV, S. 1291.

Fettdrüsen zu sprechen (Salvia glutinosa, Fig. 78). Auch zeigten viele Beobachtungen, daß nicht alle stark lichtbrechenden Tröpfchen der Drüsen und Drüsenstielzellen vorgebildet sind, sondern erst bei Einwirkung von Wasser entstehen. Beobachtet man eine Drüse von Syringa trocken unter Deckglas, so findet man im Stiel und in den Drüsenzellen nur selten „Tröpfchen"; diese treten zahlreich hervor, wenn die Drüse einige Minuten im Wasser liegt. Schleimmassen sind nach Tunmann in allen Sekretbehältern zugegen; dies wird aber von anderen Forschern bestritten. Bei der Charakteristik der ätherischen Öle muß das Vegetationsstadium der Pflanze und die Jahreszeit berücksichtigt werden (s. S. 338), sowie die Lokalisation der Sekretbehälter. Das Sekret der schizogenen Behälter ist stets von anderer Beschaffenheit wie das der Drüsen, selbst dann, wenn die Sekretbehälter wie bei den Grindelien nur durch wenige Zellagen voneinander getrennt sind. Bei den Epidermaldrüsen erfolgt mit einer Stellungsänderung (Blatt und Blüte) zuweilen ein Funktionswechsel und gleichzeitig eine völlige Veränderung im Chemismus des Sekretes. Bei Exogonium purga führen die Drüsen an den Kelchblättern subkutikular kein ätherisches Öl (wie die der jugendlichen Laubblätter), sondern nur Spuren von Fett und in den Sezernierungszellen Anthocyane. Diese Drüsen stehen dicht gedrängt und erzeugen rötliche Punkte auf den Kelchblättern (Schauapparate). Die Drüsen der Antheren von Betonica, Sideritis, Salvia, Marrubium u. a. führen wie Delpino und E. Loew (Ber. d. bot. Ges., 1886) zeigten, kein ätherisches Öl, sondern Fettgemische.

Schon aus diesen kurzen Bemerkungen geht hervor, daß der Nachweis von ätherischem Öle selbst in den Sekreträumen mit manchen Schwierigkeiten verknüpft ist. Sollen aber kleine Tröpfchen diagnostiziert werden, die diffus im Gewebe zerstreut sind, dann gestaltet sich die Diagnose noch schwieriger und wird häufig unmöglich. Leider ist gerade in diesen Fällen die Diagnose oft recht flüchtig, so hält Häfliger[1]) stark lichtbrechende Tröpfchen im Parenchym von Vanilla deshalb für ätherisches Öl, weil sie beim Kochen (!) mit Wasser verschwinden „und mit 1proz. Osmiumsäure sich leicht braun färben". In ähnlicher Weise urteilt die Mehrzahl der französischen Autoren. Nach Tunmann (Ber. pharm. Ges., 1908, S. 498) sind bei den Epidermaldrüsen sogar „Staubanhäufungen", also anorganische Fremdkörper als Harz angesprochen worden. Einem ähnlichen Irrtum ist Schwalbe bei Rhus toxicodendron verfallen, wie Gilg[2]) nachwies.

---

[1]) A. Häfliger, Beiträge zur Anatomie der Vanillaarten, Dissertat. Basel, 1901, S. 13.

[2]) E. Rost u. E. Gilg, Der Giftsumach, Rhus toxicodendron L, und seine Giftwirkungen, Ber. d. pharm. Ges., 1912, XXII, S. 296.

Zum Nachweis der ätherischen Öle ist tunlichst lebendes Material zu verwenden. Mehrtägiges Einstellen von Mentha-Arten und Salvia in Wasser setzt bereits die Löslichkeit der ätherischen Öle herab. Bei allen Methoden muß vor und nach der Reaktion eine genaue Aufnahme mit dem Zeichenapparat gemacht werden. Keine Reaktion, für sich allein ausgeführt, ist beweisend, auch nicht die Flüchtigkeit und der Geruch, da wir über die Art des Vorkommens anderer Körper mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften nicht unterrichtet sind (Benzoesäure, Cumarin u. a.). Erst Spezialreaktionen werden einige Aufklärung bringen. Eine Isolierung des Sekretes ist stets vorteilhaft. Diese kann auf mechanischem Wege geschehen (Herausheben des Sekretes mit der Nadel, Zerdrücken von Epidermaldrüsen). Bei den Hautdrüsen kann man auch mit Nestler die Blätter flüchtig mit Äther abspülen und den Rückstand des Ätherauszuges in Untersuchung nehmen. Auch kann man von der Anfertigung von Schnitten absehen und nur vom Blattrande oder von dem zusammengebogenen Blatte einen feinen Streifen mit der Schere abschneiden (Tunmann, 1908). Die im Sekretraum erzielten Befunde sind durch die Reaktionen des isolierten Sekretes zu ergänzen. Gute Dienste leistet in allen Fällen, in denen es sich nicht allein um das ätherische Öl, sondern um die anderen Bestandteile des Sekretes handelt, das freiwillig ausgetretene Sekret, welches am Drüsenstiel und an der Epidermis haftet. Hierbei ist zu bemerken, daß die Sekretion der Drüsen auch nach Sprengung der Kutikula fortdauern kann. Eine Neubildung der Kutikula findet nicht statt (s. Kutikula).

Bei mikroskopischer Betrachtung erscheinen die ätherischen Öle, falls sie nicht in Emulsionen und Gemischen auftreten, als stark lichtbrechende Tröpfchen oder Tropfen, die teils farblos, teils gelblich bis grünlich, seltener bläulich und besonders bei teilweiser Verharzung bräunlich bis rötlich sind. Die mikrochemische Diagnose benutzt die Löslichkeitsverhältnisse, Färbungen und Salzsäuredämpfe. Ausschlaggebend ist die Flüchtigkeit der ätherischen Öle.

Löslichkeitsverhältnisse: Die ätherischen Öle sind unter Deckglas leichter löslich als Harze und Fette. Sie lösen sich leicht in Weingeist, Äther, Ätherweingeist, Chloroform, Schwefelkohlenstoff und Benzol. Die meisten lösen sich leicht in Eisessig und in wässeriger Chloralhydratlösung, eine Eigenschaft, die die überwiegende Anzahl der Fette nicht teilt, namentlich nicht bei Zusatz geringer Mengen Reagens, wie dieses beim Arbeiten unter Deckglas der Fall ist. Die Sekrete von Salix, Corylus, Alnus, Cannabis, Syringa, Aesculus u. a. lösen sich sofort in verdünnten Chloralhydratlösungen. Naturgemäß ändern sich die Verhältnisse, sobald die ätherischen Öle in Gemischen

vorliegen. Stark verdünnte wässerige Lösungen von Chloralhydrat und Kaliumhydroxyd liefern brauchbare Resultate bei der Differentialdiagnose von ätherischem Öl, Harz und Fett.

Durch Alkalien und Säuren, mehr noch durch Jodreagentien, vor allem durch Chlorzinkjod nehmen viele Öle intensive Färbungen (rötlich, seltener gelblich) an. Die Ursachen dieser Färbungen sind meist unbekannt. In einigen Fällen kommt die Jodfärbung Lactonen zu (Alantolacton, Santonin).

Zu Färbungen lassen sich die bei den Fetten, Harzen und Korkmembranen aufgeführten Farbstoffe und Reagentien benutzen. Vorteilhaft werden die Lösungsmittel mit Farbstoffen kombiniert (vgl. S. 247). Die französischen Autoren benutzen nach Guignard eine essigsaure Lösung von Alkannin (s. Harze). Über die Färbung mit Violett de Paris nach Perrot s. weiter unten. Die Färbung mit Osmiumsäure ist auch hier wenig beweisend. Gerbstoffe werden durch Eau de Javelle entfernt, dann wird gefärbt und schließlich werden die gefärbten Schnitte mit Essigsäure, Chloralhydrat oder Kalilauge behandelt.

Salzsäuredämpfe werden von Mesnard[1]) zur Differentialdiagnose von ätherischem Öl und Fett benutzt (S. 253). Beide zeigen Tropfenbildung, die ätherischen Öle sofort, Fette erst nach 24 Stunden und längerer Zeit. Die goldgelben Tröpfchen des ätherischen Öles verschwinden wieder, Fetttropfen bleiben erhalten. Die Präparate gelangen auf dem Deckgläschen in einen Hängetropfen von stark zuckerhaltigem Glyzerin. Dem Objektträger sind zwei Glasringe aufgekittet, zwischen denen sich die Salzsäure befindet. Der äußere Ring ist höher und auf ihm ruht das Deckglas mit dem Hängetropfen. Das ätherische Öl, das anfangs in goldgelben Tropfen hervortritt, ist nach 25—30 Stunden völlig verschwunden, dann ist der Zellinhalt auf einen einzigen Tropfen zusammengezogen. Werden jetzt die Präparate auf zwei Sekunden Joddämpfen ausgesetzt, dann färbt sich das Fett gelb. Anwesende Gerbstoffe (Viola) werden durch Eintauchen der Schnitte auf einige Minuten in eine Lösung von wolframsaurem Natrium zuvor gefällt. Das ätherische Öl wird in solchen Fällen mehr rötlich. Nach Mesnard sollen nun die ätherischen Öle der Blüten im Zellinhalt auftreten und zwar meist in der oberen Epidermis (Jasmin, Veilchen, Rosen), weniger in der unteren Epidermis (Tuberosen) oder in beiden Epidermen (Orangeblüten).

Bei einigen Mentha-Arten lieferte Tunmann das Verfahren gute Erfolge. Den zur Reaktion erforderlichen Objektträger hatte Seibert-Wetzlar in dauerhafter Form hergestellt.

---

[1]) E. Mesnard, Rech. sur le mode de production de parfum d. l. fleurs, Compt. rend., 1892, CXV, S. 892.

Die Verdunstungsmethode ist beim Nachweis der ätherischen Öle ausschlaggebend, denn ätherische Öle sind leicht flüchtige Stoffe. Die Resultate sind nur dann leicht zu erkennen, wenn die Öle nicht in Gemischen vorliegen. Verbleiben Rückstände, so muß eine Kontrolle mit Lösungsmitteln vor und nach dem Verfahren erfolgen. Bisher wurden die ätherischen Öle durch Aufkochen mit Wasser oder durch trockene Wärme vertrieben. Bei der Kochmethode werden die Präparate einige Minuten mit Wasser aufgekocht und vor und nach dem Kochen unter dem Mikroskop durchmustert. Die ätherischen Öle müssen nun aus den Schnitten entfernt sein, während Fetttropfen in den Präparaten zurückbleiben. Das Kochwasser läßt den Geruch des betreffenden ätherischen Öles erkennen. Doch ist zu beachten, daß, besonders aus dünneren Schnitten, kleinere Fetttropfen auf mechanischem Wege ebenfalls entfernt werden können. Außerdem wird bei vielen Epidermaldrüsen die Kutikula beim Kochen gesprengt, so daß aus dem Sekretraum nicht nur das ätherische Öl, sondern das gesamte Sekret herausfließt. Um diesen Übelstand zu vermeiden, beläßt A. Meyer[1]) die nicht mit einem Deckglase bedeckten Präparate bei 130° zehn Minuten lang im Trockenschrank. Doch wurde von Tschirch[2]) eingewendet, daß bei dieser Behandlung und selbst bei höherer Temperatur viele ätherische Öle einen harzigen Rückstand hinterlassen, was bei der Anwendung trockener Wärme wohl möglich erscheint. Immerhin ist die Methode bei zarten Objekten und bei einzelligen Lebewesen brauchbar, besonders wenn nur geringe Mengen ätherischer Öle vorliegen. So hatte Hartig[3]) die kleinen, stark lichtbrechenden Inhaltskörper in den Sporen von Merulius lacrymans als Fetttropfen angesprochen, die bei der Keimung verbraucht werden sollten. Hingegen konnte sie Wehmer[4]), der sie in allen jüngeren Sporen antraf, innerhalb einer Stunde bei mäßiger Temperatur, nach längerem Liegen an der Luft auch bei Zimmertemperatur zur Verdunstung bringen und hält sie für ätherisches Öl, das wahrscheinlich den champignonartigen Geruch der trockenen Merulius-Fruchtkörper bedingt.

Die Nachteile, die das Kochen mit Wasser und trockene Wärme mit sich bringen, lassen sich durch Anwendung von Dämpfen vermeiden. Man stellt zwei kleine runde Rahmen (5 cm Durchmesser) aus

[1]) A. Meyer, Das Chlorophyllkorn, S. 28.

[2]) A. Tschirch, Die Einwände der Frau Schwabach gegen meine Theorie der Harzbildung, Ber. d. bot. Ges., 1901, XIX, S. 25.

[3]) Hartig - v. Tubeuf, Der echte Hausschwamm, 1903, II. Aufl., S. 24.

[4]) C. Wehmer, Die Natur der lichtbrechenden Tröpfchen in den Sporen des Hausschwammes, Ber. d. bot. Ges., 1911, XXIX, S. 483.

Fischbein oder aus dünnem Rohr her, die auf die Öffnung eines kleinen Kochtöpfchens passen. Die Rahmen werden mit feiner Gaze (Mull) überzogen. Die Schnitte werden auf dem einen Rahmen ausgebreitet und der andere Rahmen wird aufgelegt; sie liegen auf diese Weise fest zwischen zwei Mullagen. Man kann auch zwei Drahtnetze verwenden. Im Kochtöpfchen (kleine Blechschachtel) wird Wasser bis zum Sieden erhitzt und beim Aufsteigen der Dämpfe der Rahmen mit den Schnitten aufgelegt. Die Dämpfe durchströmen die Schnitte, welche keine mechanischen Verletzungen erleiden, und entführen die ätherischen Öle in wenigen Minuten (3—5). Bei mit ätherischem Öle imprägnierten Holundermarkscheiben sind harzige Rückstände nicht zurückgeblieben, auch nicht bei Epidermaldrüsen, vorausgesetzt, daß bei diesen das Sekret nur aus ätherischem Öle bestand. Hingegen bleibt die Kutikula erhalten, was beim Kochen der Schnitte mit Wasser nie (Labiaten) oder doch nur selten (Compositen) der Fall ist. Man kann ferner auf den Rahmen ein passendes, möglichst tiefes Uhrglas legen, in dem sich die Wasserdämpfe nebst dem ätherischen Öle ansammeln. Doch ist es angebracht, das Uhrglas alle 1—2 Minuten durch ein anderes zu ersetzen, sonst fließen die kondensierten Destillationsprodukte ins Kochwasser herab. Für die Schnitte selbst ist hierbei kein Nachteil zu befürchten, falls sie in der Mitte des Mullrahmens liegen. Die Uhrgläser mit den Destillaten werden zur Abkühlung auf eine Glasplatte gelegt und die Destillate untersucht.

Es war bereits erwähnt (S. 339), daß ätherische Öle in Gemischen mit Fetten auftreten. Bei Cypripedien fand Nestler[1]) ebenfalls Fettsäuren (Ölsäuren?) im Sekretraum (s. auch Capsaicin). Die in Sporangien von Mortierella van Tieghemi vorkommenden glänzenden, stark lichtbrechenden Kugeln, die aus zahlreichen kleinen Kügelchen zusammengesetzt sind, werden mit Osmiumsäure braun, lösen sich aber nur zum Teil in Chloroform und in Weingeist. Nach Bachmann[2]) liegt ein Gemisch von Fett und ätherischem Öl vor; letzteres ist vielleicht der Träger des eigentümlichen Geruches des Pilzes.

Wir dürfen uns nun nicht damit begnügen, ein ätherisches Öl als solches im Gewebe mit Sicherheit zu diagnostizieren. Aufgabe der Mikrochemie muß es sein, auch die einzelnen Bestandteile der Öle zu ermitteln. Dann erst wird sich das Schicksal der ätherischen Öle im Pflanzenkörper ganz aufklären lassen. Denn die von Charabot und seinen Schülern gegebenen Deutungen über die Veränderung der ätherischen Öle müssen notwendigerweise eine mikrochemische Ergänzung

---

[1]) A. Nestler, Das Sekret der Drüsenhaare der Gattung Cypripedium, Ber. deutsch. bot. Ges., 1907, XXV, S. 554.

[2]) H. Bachmann, Mortierella van Tieghemi nov. sp., Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, XXXIV, S. 277.

erfahren. Die makrochemischen Befunde zeigen nur an, daß sich die Öle im Laufe der Vegetation verändert haben. Zu ermitteln bleibt, wo die Veränderung im Chemismus stattgefunden hat. Diese kann auch, entgegen Charabot, im Behälter selbst erfolgt sein. Die einzelnen Bestandteile der Öle (Terpene, Alkohole, Phenole, Aldehyde u. a.) können allerdings in wässeriger Lösung sowohl die Zellulosemembran als auch „die lebende Plasmahaut äußerst leicht durchdringen", wie Overton angibt, der hiermit auch die Tatsache in Zusammenhang bringt, „daß in untergetauchten Wasserpflanzen ätherische Öle nicht aufzutreten pflegen".

Zur vorläufigen Analyse der Öle kämen basische Anilinfarben in Betracht. Overton[1]) hat auf Grund makrochemischer Versuche festgestellt, daß Terpene und Gemenge dieser beim Schütteln mit Methylenblau und Rosanilin (Chlorhydrate) in wässeriger Lösung (1 : 50000) fast gar keinen Farbstoff aufnehmen (Terpentinöl, Origanumöl, Zitronenöl, Krummholzöl). Phenole nehmen jedoch den Farbstoff auf und färben sich um so intensiver, je konzentrierter die Phenollösung ist (Thymol, Eugenol, Thymian- und Nelkenöl, nicht Menthol). Phenoläther (Anisol, Anethol, Resorzindimethyläther, Hydrochinondimethyläther, also auch Anisöl, Bergamottöl) speichern nur wenig Farbstoff. Hingegen speichern aromatische Aldehyde (Benzaldehyd, Salizylaldehyd, Zimtaldehyd, auch Zimtöl) sehr leicht den Farbstoff aus Lösungen 1 : 100000. Vanillin nimmt die Farbstoffe leicht auf, weniger leicht Piperonal. Beim Schütteln der Farblösungen mit aromatischen Ketonen geht der größere Teil des Farbstoffes in die aromatische Phase über, so beim Kümmelöl (50 % Carvol). Auch Senföl färbt sich 30mal stärker als das Wasser. Eine Durchprobung dieser Befunde auf mikrochemischem Gebiete wäre sehr erwünscht.

Von Perrot[2]) liegen in dieser Richtung schon Versuche vor. Er gebraucht zur Färbung „Violet de Paris" (ein Methylviolett). Der Farbstoff färbt in weingeistiger Lösung Membran und Protoplast, mit genügender Menge Essigsäure versetzt nur Sekrete (0,1 Violet de Paris, 10 ccm Eisessig, 100 ccm Alkohol (90 %), 90 ccm destilliertes Wasser; 10 ccm dieser Stammlösung mit 10 ccm Essigsäure und 80 ccm Weingeist (40 %) geben das Reagens). Mit diesem Reagens färben sich blau: Zimt-, Mentha-, Lavandula-, Anis-, Sternanis-, Senf-, Myristica-, ätherisches Mandel-, Gaultheria-, Geranium- und Kampferöl; außer-

[1]) E. Overton, Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle, Zeitschr. f. wiss. Bot., 1900, XXXIV, S. 669.

[2]) Em. Perrot, Ein neues Reagens auf ätherische Öle, L'union pharmacien, 1891, S. 253.

dem werden Borneol, Eukalyptol, Thymol und Eugenol gefärbt. Nicht gefärbt werden Oleum pini, terebinthinae, citri, cedri, bergamott., santali und balsami copaivae. Daher kann man sagen, daß reine Kohlenwasserstoffe und fette Öle nicht gefärbt werden, sondern nur diejenigen ätherischen Öle, welche Alkohole, Aldehyde oder Phenole enthalten.

Nach Guilliermond und Mangenot[1]) ist Indophenolblau das beste Färbungsmittel für ätherische Öle. Man läßt einige Minuten in der Farblösung und beobachtet in Wasser. Man kann auch in Sirop Apáthy oder Glyzeringelatine bringen. Man sieht das ätherische Öl als sehr feine blauviolette Körnchen im Zytoplasma der sezernierenden Zellen.

In geeigneten Fällen kommen als Reagentien Phloroglucinsalzsäure (Czapek[2])) für Eugenol, Anethol u. a., Vanillinsalzsäure sowie Fuchsinschweflige Säure[3]) für Aldehyde in Betracht.

Kugeln, die in den Hautdrüsen von Alnus viridis zu beobachten sind, wenn aus den Schnitten das Harz mit 70proz. Weingeist herausgelöst ist und dann eine Färbung mit Sudan vorgenommen wird, hält Dormann[4]) für Polyterpene. Läßt man Javellesche Lauge längere Zeit einwirken, dann sind die Kugeln verschwunden; mit Sudan färben sich dann die ganzen Drüsen rot. Die Kugeln treten aber wieder auf, wenn man die Schnitte in Javelle, Glyzerin oder Wasser erhitzt.

Zu den Sekretanten rechnet A. Meyer[5]) auch die zuerst von Holle (Über die Zellenbläschen der Lebermoose, Heidelberg 1857) beschriebenen Ölkörper der Lebermoose. „Die emulsionsartigen Sekretanten liegen in Vakuolen des Zytoplasmas. Wenn sie im Zytoplasma neu entstehen, so sind sie schon aus dem Dispersionsmittel und sehr kleinen Öltröpfchen zusammengesetzt; während sie heranwachsen,

[1]) A. Guilliermond u. G. Mangenot, Observations cytologiques sur le mode de formation des essences, Compt. rend. Acad. sciences, 1923, CLXXVII, S. 600.

[2]) F. Czapek, Zeitschr. physiol. Chem., 1889, XXXVII, S. 151.

[3]) 2 ccm wässerige Lösung von saurem Natriumsulfit (spez. Gew. 1,27) und 100 ccm wässerige Fuchsinlösung (0,1 %) werden gemischt, nach 1 Stunde mit 1 ccm konz. Salzsäure versetzt und gut verschlossen aufbewahrt; oder man löst durch Anreiben 0,1 Fuchsin und 0,7 Natriumbisulfit in 88,0 Wasser, füllt in eine Glasstöpselflasche und setzt nach 1 Stunde 25 Tropfen konz. Schwefelsäure zu. Die Lösung muß farblos sein.

[4]) F. Dormann, Zur Kenntnis der Hautdrüsen und der Harzexkretion von Alnus viridis, Sitzgsber. Wien. Akad. Wissensch. Math. naturw. Kl., Abt. 1, 1924, CXXXIII, S. 585.

[5]) A. Meyer, Morphologische und physiologische Analyse der Zellen usw., S. 350ff.

werden die Öltröpfchen meist größer." Über das Verhalten der Ölkörper hat A. Meyer folgendes festgestellt: Selbst in 25proz. Weingeist lösen sich die Tröpfchen allmählich, aber ohne vorher zusammenzufließen; in Eisessig und 15% Wasser fließen sie zusammen und lösen sich sehr langsam, auch in Chloral lösen sie sich nach vorherigem Zusammenfließen. Durch 33proz. Kalilauge werden sie nicht angegriffen. Werden die Präparate mit rauchender Salpetersäure 12 Stunden eingeschlossen, dann sind von den Zellen nur noch die Membranen übrig, in deren Mitte je ein bis 14 μ großer stark von Luftblasen durchsetzter Tropfen liegt. Konzentrierte Schwefelsäure löst ganz oder bis auf einen kleinen Rest. Mit Pikrinsäure (gesättigte wässerige Lösung) färben sich weder Dispersionsmittel noch Öl gelb, mit Nilblau werden die Öltropfen hellrot (Zellsaft und Membran blau). Mit Osmiumsäure werden die Öltropfen schwach braun. Nach zweistündigem Erhitzen auf 150° ist das Öl verflüchtigt.

Um die Verteilung des ätherischen Öls im Blütenparenchym und seine Lokalisation im Zellplasma festzustellen, benutzte Mazurkiewicz[1]) außer dem Mesnardschen Verfahren folgende:

1. Die Schnitte kommen 24 Stunden in kaltes Wasser, dann ebenso lange zur Verseifung der Fette in eine Mischung gleicher Volumina von 20proz. Ammoniak und gesättigter wässeriger Kalilauge und zuletzt wieder 24 Stunden in 1proz. Osmiumsäure.

2. Ein Teil der Schnitte kommt unmittelbar, ein anderer, nachdem er 10 Minuten mit Wasser ausgekocht war, auf 24 Stunden in eine gesättigte wässerige Lösung von Cyanin oder Chinolinblau. Außer dem ätherischen Öl werden auch etwa vorhandene Suberinmembranen gefärbt. Zu intensiv gefärbte Schnitte können mit Glyzerin entfärbt werden.

Er fand so, daß das ätherische Öl in allen untersuchten Fällen im Hautplasma normaler Parenchymzellen vorhanden war. Im einzelnen fand er es bei

Lilium candidum L. in der unteren Epidermis, selten in den Zellen der oberen, des Griffels und der Staubfäden,

Convallaria majalis L. in der unteren Epidermis und der benachbarten Mesophyllschicht,

Polianthes tuberosa L. in der oberen und unteren Epidermis und der an die untere Epidermis grenzenden Mesophyllschicht,

[1]) W. Mazurkiewicz, Über die Verteilung des ätherischen Öles im Blütenparenchym und über seine Lokalisation im Zellplasma, Zeitschr. allg. österr. Apoth. Ver., 1913, LI, S. 841.

Dianthus caryophyllus L. in beiden Epidermen der Kronenblätter, in einigen Zellen der benachbarten Mesophyllschicht, in einzelnen Zellen des Griffels und der Staubfäden,

Philadelphus coronarius L. in den Epidermiszellen der Blumenblätter,

Rosa L. in den Papillen der oberen Epidermis der Kronenblätter, seltener in den Zellen der unteren Epidermis, im Griffel und den Staubfäden,

Lathyrus odoratus L. hauptsächlich in den Zellen der unteren Epidermis der Kronenblätter,

Heliotropium peruvianum L. in den Papillen der Epidermis der Kronenblätter,

Erythraea centaurium Pers. in der oberen Epidermis der Kronenblätter und einzelnen Epidermiszellen der Staubfäden und des Griffels.

Harze

Die Harz-Sekrete sind komplizierte Körpergemische, deren Entwirrung mit großen Schwierigkeiten verknüpft ist[1]). Zu den aus den Handelsharzen isolierten Stoffen zählen: Harzalkohole, -ester, -säuren, Resene (indifferente, in Alkalien unlösliche Stoffe), aliphatische, glykosidische und gefärbte Harzstoffe, ferner Gummi, ätherische Öle, flüssige aromatische Ester, aromatische Aldehyde, Enzyme, Bitterstoffe.

Der Pflanze dienen die Harze vielleicht als Schutzmittel, vorzüglich als Wundschutzmittel (de Vries), wozu sie nicht nur durch ihre klebrige Beschaffenheit, sondern auch durch ihren Gehalt an antiseptischen Stoffen (Benzoesäure, Zimtsäure) geeignet sind. Nicht nur die harzigen Sekrete normaler oder durch Wundreiz entstandener, endogener Behälter verkleben Wunden, sondern auch die harzigen Sekrete verschiedener Blattdrüsen (Grindelien, Eriodictyon).

Reinitzer[2]) denkt sich die Bildung der Harze folgendermaßen: Die Bestandteile werden „von dem Protoplasma der Drüsenzellen gebildet, treten in sehr kleinen Mengen durch die Zellhaut nach außen, bleiben in der Schleimschicht liegen, sammeln sich so an, fließen zu Tropfen zusammen und werden dadurch sichtbar. Größere Tropfen durchbrechen den Schleim und sammeln sich im mittleren Hohlraum an. Wird viel dünnflüssiger gummiartiger Schleim gebildet, so entsteht ein milchiges Gemenge, das beim Eintrocknen ein Gummiharz liefert". Für die Pflanze selbst sind die Harze in den meisten Fällen ein wertloser Abfall.

Harzbildung außerhalb von — inneren — Drüsen wurde von v. Guttenberg[3]) bei Lysimachia vulgaris beobachtet. Man findet hier regellos im Meso-

---

[1]) Die zahlreichen Harz-Arbeiten von A. Tschirch und seinen Schülern haben auf botanischem und chemischem Gebiet mehr Schaden als Nutzen gestiftet.

[2]) F. Reinitzer, Die Harze als pflanzliche Abfallstoffe, Mitteilg. d. naturwissensch. Ver. f. Steiermark, 1913, L, S. 8.

[3]) H. v. Guttenberg, Die Harzdrüsen von Lysimachia vulgaris L., Planta, 1928, V, S. 232.

phyll zwischen zwei parallelen Zellketten befindliche oft sehr lange Sekretstreifen. Auch der Inhalt jener Zellen kann verharzen. Es werden dann mehrere Sekrettropfen gebildet, die zu großen Klumpen zusammenschmelzen.

Der größte Gehalt an ätherischem Öl tritt bei Pinus silvestris in den jungen Nadeln auf, der Ölanhäufung folgt die des Harzes; der Harzgehalt nimmt im zweiten Jahr noch zu (Pigulewski u. Saikina)[1].

Das Harz der Tabakblätter findet sich im chlorophyllhaltigen Parenchym, das von Pinus silvestris, Picea pungens und Abies sibirica tritt außer im Harzkanal in den benachbarten Epithelzellen, sowie im Leitbündel (namentlich der Epidermis) und in den grünen Parenchymzellen auf. Die Bildung erfolgt — entgegen Tschirch — nur in den letztgenannten Gewebeteilen, die Harzbehälter sind nur zeitliche Aufbewahrungsorte (Stshepkina)[2]. Vgl. dazu Kapitel resinogene Membran.

Die Zusammensetzung, die das harzige Sekret innerhalb des Sekretbehälters hat, stimmt keineswegs völlig mit der des isolierten Handelsharzes überein. Beim Austritt des Sekretes aus dem Behälter (bei der Gewinnung, auch bei lysigener Erweiterung des Behälters) gelangen Inhalte benachbarter Gewebe in das Harz. Leichtflüchtige Anteile verdunsten, feste Anteile nehmen zu. Überdies finden selbst im isolierten Harze Umsetzungen statt, neue Stoffe können z. B. durch Oxydation entstehen. Bei mikrochemischen Studien ist die Individualität der Pflanze zu berücksichtigen, sowie das Vegetationsstadium. Die größte Menge schleimiger Anteile findet sich nicht immer, wie die Literatur angibt, in jugendlichen Behältern, sondern überwiegt zuweilen im Alter (Ferula, Exogonium). Zur Zeit wissen wir nicht, ob alle und bis zu welchem Grade die von den Chemikern in den einzelnen Harzen aufgefundenen Körper auch im Sekretbehälter vorgebildet sind. Dies gilt von den Enzymen, Gummi, Aldehyden u. a. Es ist naheliegend, den Enzymen eine Rolle bei der Harzbildung zuzuschreiben. Ein großer Teil der die Harze bildenden Stoffe wandert in fertigem Zustande aus den benachbarten Zellen in den Behälter (Säuren, Aldehyde u. a.). Auch Magnesium ist bei den bisher näher studierten Objekten (Gingko, Ferula, Capsicum, Angelica, Exogonium u. a., abgesehen von den Milchröhren) im Sekret aufgefunden worden (S. 194). Die Mikrochemie wird die anorganischen Anteile der Sekrete ebenfalls berücksichtigen müssen.

[1]) G. Pigulewski und S. Saikina, Beitrag zur Bildung des ätherischen Öls und des Harzes bei Nadelhölzern, XII, Bildung von ätherischem Öl und Harz bei Pinus silvestris (XI Chem. Centralbl., 1923, I, 1055), Chem. Centralbl., 1929, I, 2930.

[2]) T. V. Stshepkina, Mikrochemische Untersuchung der Lokalisation des Harzes und des ätherischen Öles in Tabakblättern und Koniferennadeln, nach N. F., XIII, S. 404.

Bei der Mannigfaltigkeit im Chemismus der Harze kann es kein für alle Harze brauchbares Reagens geben. Das Reagens (Kupferazetat), welches am ehesten Anspruch auf ein allgemein brauchbares Gruppenreagens machen kann, ist bei vielen Harzen noch nicht erprobt. Harze sind Gemische. Die einzelnen Bestandteile der Gemische werden je nach ihrer Menge die Reaktionen mehr oder weniger beeinflussen. Bei chemisch bereits näher studierten Harzen wird es ratsam sein, einen oder mehrere der charakteristischen Anteile nachzuweisen. Der Anfang in dieser Richtung ist bereits gemacht (Umbelliferon, Ferulasäure, Zimtsäure u. a.). Wesentlich erleichtert wird der Nachweis durch die Tatsache, daß Harz nur in ganz bestimmten Geweben (Behältern, Wundgeweben) aufzutreten pflegt. Relativ leicht gelingt es, Harz in frischen Pflanzen nachzuweisen.

Verfügt man über lebendes Material, dann wird das Sekret zunächst isoliert. Die Isolierung ist leicht durchführbar. Die Konsistenz des Harzes hängt oft vom Vegetationsstadium ab. Gewöhnlich liegen zähflüssige Substanzen vor. Es ist aber umständlich, mit zähflüssigen Stoffen zu arbeiten, und selbst feste Harzmassen werden im isolierten Zustande bei den Reaktionen leicht fortgeschwemmt. Wir saugen daher das isolierte Harz in ausgekochte (wundfreie) Holundermarkscheiben auf. Mit diesen „Harzscheiben“ stellen wir die Vorprüfungen an. Nun werden die Reaktionen nicht mehr durch Gewebe und deren Inhalte beeinträchtigt, sie fallen reiner aus und sind sicherer. Als Lösungsmittel (teils unter Deckglas durchgesaugt, teils in Schälchen auf die Harzscheiben einwirkend) wenden wir die üblichen an (verdünnter Weingeist, absoluter Alkohol, Äther, Chloroform u. dgl.). In den meisten Fällen wird es sich um die Unterscheidung von Fett, Harz und ätherischem Öle handeln. Ätherische Öle werden durch Mikrodestillation (S. 343) in 3 Minuten (bei festen Harzen in 5—8 Minuten) entfernt. Die vom ätherischen Öle befreiten Scheiben werden mit Kalilauge oder mit Ammoniak auf Fett geprüft (S. 254), sowie mit Kupferazetat mazeriert und mit Farbstoffen gefärbt (s. weiter unten). Schließlich kann Schwefelsäure benutzt werden. Harze, die keine Fette führen und von ätherischem Öle befreit sind, geben mit Schwefelsäure niemals jene glänzenden Tropfen, die für Fette und Öle (S. 260) charakteristisch sind. Die vom ätherischen Öle befreiten Harze lösen sich in der Säure (evtl. schwach erwärmen) meist mit kräftigen Farben (gelb, braun, rot) teils vollständig, teils unter Abscheidung eines feinen voluminösen, seltener körnigen Gerinnsels (violettschwarz Tolubalsam, tiefschwarz Sagapen, hellrot Galbanum, olivbraun Opopanax, weißlich Euphorbium) oder schleimiger formloser Ballen (Euphorbium). Bei starker Vergrößerung finden sich in den Niederschlägen kleine

helle Tröpfchen, die aber nie ineinanderfließen und sich vergrößern, wie es Fetttropfen tun. Phytosterine geben gleichfalls nicht derartige Tropfen.

Silbernitrat[1]), das harzsaures, in Äther lösliches Silber bildet, während fettsaures Silber in Äther unlöslich ist, gibt keine eindeutigen Resultate am Objektträger; die Methode wurde nur zum makrochemischen Nachweis empfohlen.

Die erhaltenen Reaktionen werden an Schnitten nachgeprüft. Es sind vorteilhaft möglichst kleine Schnitte zu wählen, die nur die nötigen Zellen enthalten. Die vom ätherischen Öle befreiten Schnitte werden auf Fette geprüft und mit Kupferazetat behandelt.

Kupferazetat, sachgemäß angewandt, ist ein in manchen Fällen brauchbares Reagens zum Nachweis der Harze. Die Reaktion besteht in einer Grünblaufärbung. Das Reagens hat Franchimont[2]) eingeführt, nachdem er mit der Hansteinschen Anilinlösung (s. S. 354) keine brauchbaren Resultate erhalten hatte, sondern nur „verschieden schillernde Farben auf allen möglichen Geweben". Größere Pflanzenstücke werden wenigstens einen Monat lang in einer konzentrierten wässerigen Lösung von Kupferazetat mazeriert. Alsdann wird das Reagens, welches auch als Unverdorben-Franchimontsches bezeichnet wird, gut mit fließendem Wasser ausgewaschen. Aus dem Material werden die Präparate hergestellt, welche sich in Glyzeringelatine einschließen lassen und das Harz in smaragdgrüner Färbung zeigen. Mazeriert man kürzere Zeit, wie Franchimont (6 Tage) oder Schwabach (10 Tage) angeben, dann erhält man überwiegend nur eine gelbliche Färbung, die zumal in chlorophyllhaltigen Geweben sich nicht genügend scharf abhebt; außerdem wird das Harz erst bei längerer Mazeration gut gehärtet. Oft ist Erwärmen, selbst Aufkochen in der Lösung zu empfehlen.

Viele Mißerfolge mit diesem Reagens sind sicher darauf zurückzuführen, daß die Kupferlösung nicht genügend lange einwirkte. Ob sich alle Harze färben, ist noch nicht ermittelt; jedenfalls werden alle Harze von saurem Charakter reagieren, die Kupfersalze der Harzsäuren bilden. Nun verlangt die Reaktion eine vorsichtige Beurteilung und eine weitere mikrochemische Kontrolle, denn auch Fettsäuren geben blaugrüne Salze. So ist die Blaufärbung des Sekretes von Capsicum (s. Capsaicin) auf die Anwesenheit von Fettsäuren zu setzen und die von Schwabach[3]) beobachteten Färbungen in den Epithelzellen der

---

[1]) Th. S. Gladding, Quantitative Scheidung des Harzes von Fetten, Amer. chem. journ., 1882, III, S. 416.

[2]) Franchimont, Beiträge zur Entstehung und chemischen Zusammensetzung der sogenannten Terpenharze, Leiden 1871, S. 41.

[3]) E. Schwabach, Zur Kenntnis der Harzabscheidungen in Koniferennadeln, Ber. d. bot. Ges., 1899, XVII, S. 291.

Koniferengänge scheinen nach Tunmann ebenfalls auf Fette hinzuweisen, zumal die Verfasserin selbst sagt: „Auch die Epithelzellen waren teilweise gefärbt. Bei letzteren allerdings war die Färbung nie so intensiv, wie die des Harzes, das sich im Kanal befand." Die Grünfärbung des Harzes von Polyporus officinalis wird fast ausschließlich durch die Agaricinsäure bedingt.

Die Reaktion läßt sich zur Unterscheidung der Agaricus-Droge von seiner Verfälschung, den Fruchtträgern von Polyporus sulfureus Fr., benutzen. Während P. off. schon nach 5tägiger Mazeration tiefblaugrüne Stücke gibt, bleibt der harzarme P. sulfureus selbst nach monatelanger Mazeration ungefärbt (Tunmann, Schw. Wochenschr., 1909).

Bei ätherischen Ölen gelingt die Reaktion nicht oder sie ist undurchführbar. Letzteres ist bei vielen Epidermaldrüsen der Fall. Bei verschiedenen Labiaten fand Tunmann nach 14 Tagen noch keine Färbung; bei längerem Liegen der Objekte in Kupferazetat wird meist die Kutikula gesprengt und das flüssige Sekret fließt ab. Bei den Kompositen war das Sekret nach 2 Monaten wohl gehärtet, aber nicht gefärbt. Zu versuchen wäre Dauerbeobachtung zugekitteter Deckglaspräparate.

Franck[1]) findet, daß das von Tschirch und Tunmann hauptsächlich angewandte Kupferazetat kein eindeutiges Reagens auf Harze ist, da es z. B. auch Wachsarten färbt.

Sie verwendet zur Unterscheidung das verschiedene Verhalten von Coniferenharzen und ätherischem Öle und Fetten gegenüber folgenden Reagentien:

	Fett	Harz und ätherisches Öl
Verdünnter Weingeist	Unlöslich	Löslich
Wässeriges Chloral	Unlöslich	Löslich
Eisessig	Unlöslich	Löslich
Kalilauge-Ammoniak	Verseifung	In der Kälte keine Verseifung
Konz. Schwefelsäure	Unlöslich	Löslich unter Gelb- bis Braunfärbung.

Zur Fixierung des Harzes dient nach Hannig[2]) am besten eine Lösung von 1% Chromsäure in gesättigtem Kupferazetat. Bei Gegenständen, die lange liegen bleiben sollen, muß nach einigen Monaten oder sobald die Fixierung beendigt, das Fixiermittel ausgewaschen und durch reine Kupferazetatlösung ersetzt werden.

[1]) A. Franck, Über die Harzbildung in Holz und Rinde der Koniferen, Botan. Archiv, 1923, III, S. 173.

[2]) E. Hannig, Untersuchungen über die Harzbildung der Koniferennadeln, Zeitschr. f. Botan., 1922, XIV, S. 385.

Kupferoxalat in heißer konzentrierter wässeriger Lösung wurde von Zalewski[1]) zum Nachweis der Harzfüllung der Resinozysten der Begonien angewandt. Doch mußten die Präparate auf dem Objektträger in oxalsaurem Kupfer auf über 100° erhitzt werden. Beim Schmelzen des Harzes trat die smaragdgrüne Farbe hervor, die sich in Glyzerin gut hielt. (Eine Behandlung mit Kupferoxalat bei Zimmertemperatur hatte selbst nach 2 Monaten keinen Erfolg.)

Zur Färbung der Harze werden vorzugsweise Alkanna und Osmiumsäure herangezogen, wie es scheint besonders deshalb, weil diese Reagentien zu dem eisernen Bestande eines jeden Mikroskopikers gehören und daher jederzeit zur Hand stehen. Selbstredend können alle Fett- und Korkfarbstoffe benutzt werden. An dieser Stelle erscheinen einige Bemerkungen über die Alkannafärbung sowie über das Hansteinsche Anilingemisch angebracht.

Der Farbstoff der Alkannawurzel wurde in der mikroskopischen Technik zuerst von Waldeyer[2]) benutzt. Gute Dienste leisteten auf tierhistologischem Gebiete Lösungen von Alkanna in Terpentinöl. Bald darauf gebrauchte N. J. C. Müller[3]) die Alkannawurzel zum Nachweis von Harzen; er verfuhr in folgender Weise: Zu dem im Wasser liegenden Präparate wird ein kleines Stückchen pulverfreier Alkannaborke gelegt; dann „bringt man auf beide ein dünnes Deckgläschen und gibt an dessen Rand einen kleinen Tropfen Alkohol; nach 2—3 Minuten entfernt man das Borkestückchen". Die Harze werden tiefrot gefärbt. Die Methode ist etwas umständlich, sie wird in dieser Form gegenwärtig nicht mehr benutzt.

Dippel[4]) führte 1882 die weingeistige Alkannatinktur ein, die er als Tinktionsmittel für Harze und Fette gebrauchte, die aber auch Kautschuk, verkorkte und kutinisierte Membranen färbt. Bei Anwendung dieser Tinktur treten gewöhnlich störende Ausscheidungen des Reagens auf. Diese kann man umgehen, indem man die Alkannatinktur im Reagenzglase mit soviel Wasser verdünnt bis die Flüssigkeit noch klar und durchsichtig erscheint (Tunmann)[5]). Jetzt steigert man die Wirkung durch Zusatz von Essigsäure und stellt die Lösung teils aus

---

[1]) A. Zalewski, Über M. Schönnetts Resinozysten, Bot. Centralbl., 1897, LXX, S. 50. Resinozysten nannte Schönnett halbkugelförmige der Wand inserierte Gebilde, die im Stengel, Blattstiel und Blatt einer Begonie auftreten und aus einem radial lamellierten Kopf bestehen. Zwischen den Lamellen soll nun ein festes Harz abgelagert sein, das sich in Alkohol, Äther, Schwefelkohlenstoff, Benzol, Chloroform, Terpentinöl, Xylol löst, mit Osmiumsäure schwärzt, mit Alkanna rötet.

[2]) Waldeyer, Zeitschr. für rationelle Med., 1863, XX, S. 200.

[3]) N. J. C. Müller, Untersuchungen über die Verteilung der Harze, ätherischen Öle, Gummi und Gummiharze und die Stellung der Sekretbehälter im Pflanzenkörper, Jahrb. f. wiss. Bot., 1866, V, S. 387.

[4]) L. Dippel, Das Mikroskop, 1882, II. Aufl., S. 721.

[5]) O. Tunmann, Über die Sekretdrüsen, Diss. Bern, 1900.

der Wurzel, teils aus dem käuflichen Alkannin her. Durch die Essigsäure wird die Lösung überdies haltbar; hierauf wies zuerst Guignard[1]) hin, der 10 g Alkannapulver mit 30 ccm absolutem Alkohol mazeriert und das Filtrat an einem warmen Orte eindunsten läßt. Der Rückstand wird in 5 ccm Eisessig und 50 ccm 50proz. Weingeist aufgenommen und die Lösung nach dem Absetzen filtriert. Chimani[2]) geht vom Alkannin aus, löst dieses in Äther, dampft den Ätherauszug ein und nimmt den Rückstand (zum Kautschuknachweis) in 45proz. Essigsäure auf. Die Schnitte sind vorteilhaft mit verdünnter Essigsäure anzusäuern. Auch zur Harzfärbung ist diese Lösung brauchbar, zuweilen ist aber eine schwächere Essigsäure angebracht. Zum Auswaschen und Einlegen dienen verdünnter Weingeist oder Glyzerin. In Glyzerin- und Gelatine-Präparaten hat Tunmann die Alkanninfärbung nicht haltbar gefunden; in einigen Wochen wird sie bräunlich und verblaßt schließlich ganz.

Das Hansteinsche Anilingemisch[3]), Fuchsin und Methylviolett zu gleichen Teilen in 50proz. Weingeist) ist nicht zu empfehlen und wird in neuerer Zeit nur selten benutzt. Harz soll blau, Schleim fleischfarben, Gummi rot und Plasma violett werden. Doch sind die Farbenunterschiede so gering, daß ein jeder die Färbung herausfinden kann, welche er anzunehmen gewillt ist. Auch hat die Erfahrung gelehrt, daß verschiedene Beobachter ein und denselben Farbeton verschieden auffassen. Kritische Nachprüfungen in letzter Zeit haben die Unbrauchbarkeit des Reagens zur Differentialdiagnose dargetan: „Verholzte und kutinisierte Membranen werden violett bis blau und die rote Färbung der Zellinhalte wird nicht allein durch Schleim und Gummi bedingt, sondern durch die saure Reaktion des Zellsaftes, während der sich kontrahierende Plasmakörper infolge seiner alkalischen Reaktion violett bis blau färbt“ (Tunmann). Dann entstehen bald Mischfarben. Mit diesem Färbungsmittel wurden schon Staubansammlungen, also anorganische Stoffe, für Harz gedeutet[4]).

Weitere Prüfung verdient die Beobachtung von Schenck[5]), daß sich bei vielen Pflanzenhaaren zwischen Kutikula und der Zellulosewand eine Schicht findet, die in Salz- und Salpetersäure aber nicht in Wasser quillt und die für einen harzartigen Körper angesprochen wird.

[1]) L. Guignard, Journ. de Bot., 1890, IV, S. 447.

[2]) O. Chimani, Untersuchungen über Bau und Anordnung der Milchröhren, Berner Dissertation, 1895, S. 25; Bot. Centralbl., 1895, LXI, S. 305.

[3]) I. Hanstein, Über die Organe der Harz- und Schleimabsonderung in den Laubknospen, Bot. Ztg., 1868, XXVI, S. 777.

[4]) O. Tunmann, Beitr. zur Kenntnis der Hautdrüsen, Ber. Deutsch. pharmaz. Ges., 1908, XVIII, S. 492.

[5]) H. Schenck, Untersuchungen über die Bildung von zentrifugalen Wandverdickungen an Pflanzenhaaren und Epidermis, Dissert. Bonn, 1884.

Der klebrige Überzug der Pollenkörner wird ebenfalls als Harz angesprochen. Lopriore[1]) hielt ihn bei Araucaria Bidwillii für Harz, da er sich in Weingeist leicht löste und mit Alkanna färbte. Küstenmacher[2]) findet ganz allgemein, daß die Tapetenzellen und ihr Inhalt in meist gelbe bis rote, selten farblose Harzbalsame übergehen („lysigene Exkretbehälter"), welche die Pollenkörner bedecken. Dieser Balsam löst sich in Weingeist, Olivenöl, reagiert mit Osmiumsäure und mit Kupferazetat. Von Helianthus annuus wurde eine größere Menge Balsam dem Pollen durch Abspülen mit Äther entzogen. Der so gewonnene Balsam löste sich orangegelb in Weingeist, die Lösung trübte sich erst bei Zusatz von 40% Wasser (Unterscheidung von Fett). Beim Erhitzen entweicht ein ätherisches Öl (am Geruch zu erkennen,) und zurück bleibt ein gelbrotes Harz, das sich in Schwefelsäure braunrot löst (Fette würden Tropfen bilden).

Bei Pilzen tritt häufig Harz auf. Bei fortschreitender chemischer Erkenntnis werden die Pilzharze sich zum Teil vielleicht als gut charakterisierte Säuren herausstellen. Sie reagieren mit Kupferazetat meist tiefgrün. Das Harz der Pilze entsteht in besonderen Harzhyphen, exogen und endogen. Die peripher gelegenen Harzhyphen erzeugen ähnlich wie die Epidermaldrüsen glänzende Harzüberzüge, die v. Wettstein[3]) bei Polyporus australis Fr. und laccatus näher untersuchte. Bei jugendlichen Drüsen ist das Sekret flüssig, bei alten fest. Die endogenen Harzhyphen unterscheiden sich bereits durch ihre unregelmäßige, bizarre Gestalt von den normalen Hyphen. Die Harzproduktion kann so reichlich sein, daß die Wände gesprengt werden, große Destruktionslücken entstehen und das Harz auch an sekundäre Lagerstätten gelangt (s. Agaricinsäure). Bei der Aufhellung leistet Ammoniak zuweilen treffliche Dienste. Vornehmlich bei Basidiomyceten treten Harzhyphen auf[4]). Bei Tuber excavatum und Hymenogaster decorus konnte Buchholz[5]) das „Gummiharz" mit Corallinsoda färben. (Über Schleimhyphen s. Schleimmembran.)

Wie weit bei den Pilzen mit der Harzbildung eine Schleimerzeugung parallel geht, bleibt zu untersuchen. Die Schleimbildung kann in

[1]) G. Lopriore, Über die Vielkernigkeit der Pollenkörner und Pollenschläuche von Araucaria Bidwillii Hook., Ber. d. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 335.

[2]) M. Küstenmacher, Propolis, Ber. d. pharm. Ges., 1911, XXI, S. 65.

[3]) R. v. Wettstein, Neue harzabsondernde Organe bei Pilzen, Sitzgsb. zool.-bot. Ges., Wien, 1885, XXXV, Sep.

[4]) G. v. Istvánffy, Ètudes relatives a l'anatomie physiolog. des champignons, Budapest 1896.

[5]) F. Buchholz, Zur Entwicklungsgeschichte der Tuberaceen, Ber. d. bot. Ges., 1897, XV, S. 211.

manchen Fällen die Harzbildung überwiegen. So sondern die Trichomhydathoden (papillöse, schlauchartige Gebilde), die auf verschiedenen Hymenomyceten, teils auf der sterilen Oberfläche des Fruchtkörpers, teils auf dem Hymenium vorkommen, nach Knoll[1]) große schleimige Tropfen ab. „In dem Schleim scheiden sich dann vielfach Kalziumoxalat oder harzähnliche Substanzen aus.“ — Nach Trotter[2]) besteht der glänzende Überzug mancher Eichengallen aus Harz; er löst sich in Äther, Schwefelkohlenstoff und Chloroform, wird mit Schwefelsäure braun, mit Alkanna rot, mit Kupferazetat grün. Das Harz ist das Produkt dicht stehender Epidermaldrüsen.

Die „anormale Harzbildung“ in Gefäßen einer Rheumart, über die Koningsberger[3]) berichtet, ist jedenfalls nur eine bassorinartige Ausfüllung, in der sich Farbstoffe und Oxymethylanthrachinone speichern. Das Produkt zählt somit zu den Kerngummiharzen, die wir vorzüglich bei den Farbhölzern, aber auch sonst im Kern- und Wundholz antreffen. Bei Haematoxylon campechianum, Pterocarpus, Caesalpinia echinata und anderen Farbhölzern hat Will[4]) die Lösungsverhältnisse dieser Füllmassen näher studiert. Die Massen in den Parenchymzellen, Markstrahlen, Libriformfasern und Tracheiden waren nicht so resistent gegen Lösungsmittel wie die der Gefäße. Eisessig, Äther, Mineralsäuren, selbst Chloralhydrat, meist auch Kalilauge sind ohne Einwirkung. Die Massen lösen sich in Weingeist, wenn die Schnitte mit chlorsaurem Kali-Salpetersäure (in der Kälte) zuvor mazeriert wurden. Das Kerngummiharz oder Kerngummi besteht aus einem Gemisch aus Gummi und Harz in wechselndem Verhältnis. Bei Umbelliferen (Ferula, Gentiana) fand Tunmann außerdem Fettsäuren.

Um Harzkugeln in Milchsäften von Hevea-Arten zu beobachten, bringt Frey-Wißling[5]) soviel einer Verdünnung von 3—6 Tropfen Milchsaft mit 10 ccm Wasser oder 1 proz. Ammoniak auf einen Objektträger, daß der Raum unter dem aufgelegten Deckglas nicht ganz ausgefüllt wird und dieses kapillar festgehalten wird. Die gelben Harzkügelchen kleben dann an Deckglas oder Objektträger, während

[1]) F. Knoll, Über die Abscheidung von Flüssigkeit an und in den Fruchtkörpern verschiedener Hymenomyceten, Ber. deutsch. bot. Ges., 1912, XXX, S. (36).

[2]) A. Trotter, Contributo alla conoscenza del sistema secretore in alcuni tessuti prosoplastici, Ann. di Botan., 1903, I, S. 123.

[3]) J. C. Koningsberger, Eine anatomische Eigentümlichkeit einiger Rheum-Arten, Bot. Ztg., 1893, LI, S. 85.

[4]) A. Will, Beitr. z. Kenntn. von Kern- und Wundholz, Berner Dissertation 1899.

[5]) A. Frey-Wißling, Microscopic investigations on the occurrence of resins in Hevea latex, Ref. in Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1929, XLVI, S. 546.

sich die Kautschukteilchen in lebhafter Brownscher Molekularbewegung befinden. Man kann zur Untersuchung auch die Tusche-Methode heranziehen. Während des Verdunstens der Tusche verflüssigen sich die gelben Harzkugeln, vergrößern plötzlich ihre Durchmesser und verlieren ihre Farbe. Die Harzkugeln lassen sich mit Sudan III färben.

Einige Bestandteile der Sekrete

Alantsäureanhydrid

Alantsäureanhydrid, Alantolakton, wird durch Destillation der Wurzel von Inula helenium gewonnen und bildet farblose Kristallnadeln F. 76°, die bei gelindem Erwärmen sublimieren.

In den schizogenen Gängen der Wurzel von Inula helenium scheiden sich beim Trocknen kristallinische Massen ab. Die Kristalle sind nicht immer gut wahrnehmbar, treten aber beim längeren Liegen der Präparate in Wasser besser hervor, Vogl[1]) hielt sie für Alantkampfer. Nach Tunmann[2]) lassen sie sich stets bei nachfolgendem Zusatz von etwas verdünnter Salpetersäure sichtbar machen. Gut entwickelte Kristalle finden sich in jedem Handelspulver und zwar derart zahlreich, daß sie neben dem Inulin die Diagnose gestatten. Der kristallinische Körper ist Alantsäureanhydrid (Fig. 79). Die Kristalle sind teils nadelförmig, teils flach rhombisch, bis 150 μ lang und 5—10 μ breit, löschen schief aus und polarisieren in grauen Farben. Sie lösen sich unter Deckglas nicht in kaltem Wasser, leicht in heißem Wasser (Unterschied von Alantkampfer), ferner in Weingeist, Äther, Alkalien (in der Wärme) und in verdünnten Säuren. Bei Zusatz von reichlich Chlorzinkjod gehen sie in rote Tropfen über (wahrscheinlich die Jodverbindung des Anhydrids); es kommt aber nicht zur Abscheidung eines kristallinischen Produktes. Die Jodfärbung des Sekretes von Inula helenium wird daher durch dieses Anhydrid hervorgerufen). Erwärmt man Schnitte

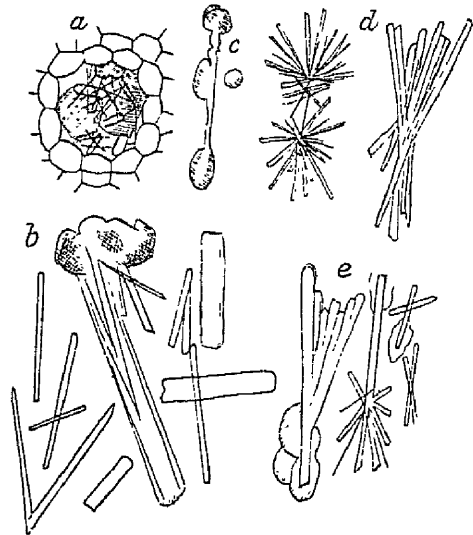



Fig. 79. Inula helenium (Wurzel, Droge), Alantsäureanhydrid: *a*) im Sekretgang eines Schnittes; *b*) im Handelspulver; *c*) mit Chlorzinkjod rote Tropfen (Jodverbindung); *d*) mit Natronlauge alantsaures Natrium; *e*) mit stark verd. Mineralsäure Kristalle von Alantsäure (Tunmann)

[1]) A. Vogl, Kommentar der 7. Ausgabe der österr. Pharmakopöe, 1892, S. 391.

[2]) O. Tunmann, Über die Kristalle in Radix Helenii, Pharm. Centralbl., 1912, LIII, S. 1175.

oder das Pulver mit verdünnter Natronlauge, so scheiden sich nach einigen Stunden Kristallbündel von alantsaurem Natrium ab. Erwärmt man die Objekte einige Minuten in Wasser und fügt verdünnte Säure (Schwefelsäure) zu, dann kommt es zur Abscheidung von Nadeln der Alantsäure. Diese könnte man leicht für Gipskristalle halten. Sie sind aber an den Enden meist gerade abgestutzt, lösen sich ungemein leicht in Wasser schon bei kräftigem Anhauchen und unterscheiden sich hierdurch vom Gips und dem Alantsäureanhydrid. Trotzdem das Anhydrid schon bei gelindem Erwärmen unzersetzt sublimiert, hat die Mikrosublimation unbrauchbare Ergebnisse. In der trockenen Wurzel verflüchtigt sich der Körper teilweise aus den Sekretgängen und gelangt an sekundären Lagerstätten (Parenchym), sogar auf der Oberfläche der Wurzel zur Kristallisation.

Asaron

Asaron (Asarin, Asarumkampfer, Trimethoxyl-propenylbenzol) ist im ätherischen Öl von Asarum europaeum (hauptsächlich Rhizom), von Acorus calamus und Acorus gramineus Soland. (Rhizom) und Piper angustifolium-Arten (Blätter) enthalten. Bei der Destillation frischer Asarum-Wurzel mit Wasserdampf scheidet sich Asaron in monoklinen Kristallen (F. 61°) aus, die leicht in Äther, Chloroform, Essigsäure und Alkohol löslich sind, sich aber kaum in Wasser lösen. Asaron ist in der Pflanze nur im ätherischen Öl der Ölzellen lokalisiert, scheidet sich beim Trocknen der Pflanzen nicht kristallinisch ab.

Beim Aufkochen oder beim Erwärmen der Präparate von Asarum europaeum (Rhizom) mit wässeriger Chloralhydratlösung erhielt Tunmann stets charakteristische Kristalle (Täfelchen), die sich in Wasser wiederum in feine Öltröpfchen auflösten. Die Kristalle entstanden auch in Präparaten, die vorher einige Tage in wenig Wasser gelegen hatten (zur Entfernung wasserlöslicher Salze), blieben aber an Weingeistmaterial aus. Möglicherweise liegt eine Asaronverbindung vor, doch bedarf der Befund weiterer Nachprüfung (Fig. 80). Sublimation und Mikrodestillation geben Tropfen von ätherischem Öle, die stark nach Moschus riechen. Die Ausscheidung von Asaron erfolgt bei Anwendung einiger Schnitte aber so spärlich und erst nach 1—2 Tagen, daß die Reaktion ziemlich wertlos ist. Erwärmen der Schnitte mit Brombromkalium führt das Öl der Ölzellen nur in braune Massen über; weingeistige Kalilauge, ebenso konzentrierte Salzsäure färben rötlich. Bringt man einige Schnitte in wenig Chloroform und setzt das Präparat (als Hängetropfen) Bromdämpfen aus, dann scheiden sich (außerhalb der Zellen) kleine kurze Nadeln aus, die wahrscheinlich das Bromid darstellen.

Asaron gibt bei mittlerer Wärme rasch ein Sublimat aus rhombischen Kristallen, die folgende Reaktion zeigen: Erwärmt man sie auf

dem Objektträger — mit Deckglas bedeckt — mit 2proz. weingeistiger Kalilauge, so lösen sie sich mit roter Farbe, die beim Kochen verschwindet. Beim Erkalten entstehen zunächst am Rand des Deckglases, später auch gegen das Innere bräunlich-gelbe bis 180 μ lange Nadeln, einzeln, in Büscheln oder Sternen. Sie verschwinden in einigen Stunden unter Bildung öliger Tropfen.

Die Orangefärbung, die Borscow an den Schnitten mit konzentrierter Schwefelsäure eintreten sah und auf das ätherische Öl zurückführte, rührt nach Kofler[1]) von Einschlüssen eines einzelligen Ringes her; für das ätherische Öl ist nach demselben Autor Titansäureanhydrid-Schwefelsäure ein gutes Reagens: Rot, später veilchenfarbig, nach etwa ½ Stunde blau.

Fig. 80 Asarum der Schnitte in Chloralhydrat (Asaronverbindung?) (Tunmann)

Svensson[2]) erhielt durch Sublimation der Pulver von Acorus calamus- und gramineus-Rhizomen nach Anfeuchten mit Phosphorsäure kristallinische Sublimate, die Parasaron (aus Asaron durch Phosphorsäure entstanden) oder Kalmuskampfer sind.

Betuloresinsäure

Aus dem Sekret der Epidermaldrüsen der Knospen und jungen Blätter von Betula alba ist die Betuloresinsäure isoliert worden, die aber nur sehr ungenügend studiert ist. Sie löst sich, ebenso wie das ganze Sekret, leicht in Äther, Weingeist, Alkalien und färbt sich mit Schwefelsäure rot. Die Schwefelsäure-Reaktion hat Behrens[3]) mikrochemisch benutzt. Junge Knospen (April) zeigten ein farbloses Sekret, das mit Vanillinsalzsäure nicht reagierte. Mit Schwefelsäure trat zunächst gelbe Färbung ein, erst nach einigen Minuten erschien die rote Farbe. Die im Gewebe gleichfalls eintretende Rotfärbung ist auf den Zuckergehalt zurückzuführen und unterbleibt, wenn die Präparate zuvor gut ausgewaschen wurden. Betuloresinsäure ist nur im Sekret und nicht im Inhalte der Drüsenzellen lokalisiert. Bei der Mikrosublimation erhält man ein sehr schlecht kristallinisches Sublimat. Da Schwefelsäure in diesem zuerst intensive Chromgelbfärbung, dann Rötung hervorruft, so scheint die Säure sublimierbar zu sein.

Cubebin

Cubebin (Methylenäther des 3-4-Dioxy-Zimtalkohols) ist neben Harz- und Cubebensäure im Sekret der Ölzellen von Cubeba officinalis Miq. zu 2,5 % enthalten und bildet im gereinigten Zustande nadelförmige Kristalle F. 125—126°,

[1]) L. Kofler, Asarum europaeum, Ein Beitrag zur Kenntnis des Rhizoms, Pharmazeut. Zentralh., 1918, LIX, S. 279.

[2]) S. E. Svensson, Über den Wurzelstock von Acorus gramineus Soland. Farmaceutisk Revy, 1929, S. 553.

[3]) W. Behrens, Hilfsbuch zur Ausführung mikr. Untersuch., Braunschweig, 1883, S. 379.

die sich leicht in Chloroform und Eisessig, schwer in Weingeist, fast gar nicht in Wasser lösen. Cubebin findet sich in den Ölzellen der Früchte (Perikarp und Perisperm) und in geringer Menge in der Fruchtspindel, während nach Peinemann[1]) die Ölzellen von Wurzel, Stamm, Blattstiel und Lamina frei von Cubebin sind.

Cubebin läßt sich mikrochemisch mit Schwefelsäure (purpurviolette Färbung) nachweisen. Es ist ratsam, die Schnitte direkt in die Säure einzulegen; die Färbung ist dann besser auf die Sekretzellen beschränkt. In der Droge (Früchte) wird das gesamte Gewebe mehr oder weniger rot und rote Streifen fließen ab, da das Cubebin das Gewebe infiltriert hat. Nach Linde kann die konzentrierte Säure mit 25—50% Wasser verdünnt werden. Die Reaktion dient zur Unterscheidung von den sog. „falschen Cubeben", die der Handelsware untergeschoben werden. Das Pseudocubebin von Piper Lowong Bl. wird mit Schwefelsäure nur gelbbraun. Cubebin, das sich zuweilen in Nadeln abscheidet, wird ferner mit Ammoniummolybdat-Schwefelsäure blau. Eine rotviolette Färbung entsteht ferner, wenn man „die Schnitte auf dem Objektträger mit etwas Phosphorsäureanhydrid bedeckt, einige Zeit an freier Luft liegen läßt, bis dasselbe etwas Feuchtigkeit angezogen hat." (Peinemann.) Die drei genannten Reaktionen treten in ähnlicher Weise mit Piperin ein. Die hierbei bei beiden Körpern auftretenden Farbentöne lassen sich nur in vitro sicher erkennen. Es gelang Tunmann nicht, Cubebin im Pulver durch Chloroform, Weingeist oder weingeistige Kalilauge zur Kristallisation zu bringen. Cubebin reagiert nicht mit Chloralhydrat (im Gegensatz zu Piperin, s. Alkaloide).

Eriodictyonon

Eriodictyonon wurde von Mossler (Zeitschr. öst. Ap. Ver., 1907, LI, S. 135) aus Eriodictyon glutinosum isoliert und aus dem ätherischen Auszuge mit Soda als gelbes Salz erhalten. Frühere Bearbeiter haben aus dem alkoholischen Auszuge Eriodictyonsäure (gelbe Blättchen, die an der Luft rot werden) gewonnen.

Die angeführten Stoffe können nur im Sekret der Hautdrüsen (Fig. s. resinogene Schicht) zugegen sein. Das harzige Sekret überzieht die vegetativen Teile der Eriodictyonarten (glutinosum, tomentosum, angustifolium) als mächtige (bis 100 μ) hohe Schicht, welche eine schwach gelbliche Masse darstellt; sie löst sich leicht in Chloralhydrat, Äther, Weingeist u. a. Auch Anilin löst sofort. Schwefelsäure löst rotgelb unter Abscheidung eines Gerinnsels. Ammoniak löst hellgelb, es fällt nach einigen Stunden ein hellgelber Niederschlag aus.

[1]) K. Peinemann, Beiträge zur pharmakognostischen und chemischen Kenntnis der Cubeben und der als Verfälschung derselben beobachteten Piperaceenfrüchte, Arch. d. Pharm., 1896, CCXXXIV, S. 204.

Beweisend ist die Reaktion mit Sodalösung (20—30 %); das Sekret löst sich unter Abscheidung eines tiefgelben voluminösen Niederschlages, der an der Luft langsam rotgelb wird. In dem Gewebe entsteht keine Reaktion, doch müssen die Schnitte direkt in die Lösungen eingetragen werden. Beim Durchsaugen oder beim Zusetzen der Reagentien zu Wasserpräparaten kann der Niederschlag in die Epidermis eindringen. Man kann auch das Sekret von der Blattfläche abschaben und dann das Sekret sowie das sekretfreie Blattgewebe gesondert untersuchen. Die von Mossler gefundenen Fettsäuren sind nicht (oder doch nur in Spuren) im Sekret enthalten, sondern entstammen dem Gewebe (und vielleicht auch der stark verdickten Kutikula).

Eugenol

Eugenol (Eugensäure, Nelkensäure, Allylguajakol) von Bonastre 1827 isoliert, eine gelbliche, nach Nelken riechende Flüssigkeit, ist in Weingeist, Äther, Eisessig leicht löslich, in Wasser unlöslich, liefert mit Kalilauge kristallinisches Eugenolkalium, wird (in weingeistiger Lösung) mit Ferrichlorid blau, mit Phloroglucinsalzsäure rötlich. Eugenol findet sich in vielen Sekreten, so im öligen Sekret von Eugenia caryophyllata, Pimenta officinalis, Cinnamomum-Arten, Illicium religiosum (Früchte), Sassafras officinale (Rinde), Ocimum basilicum u. a. Es tritt somit vorzugsweise in Ölzellen und nur selten in Epidermaldrüsen auf (Ocimum). Beim Trocknen dringt es aus den Ölzellen in das benachbarte Parenchym. Der Eugenolgehalt der Nelkenöle schwankt (79—87 %). Im Öl von Thea sasanqua sind 97 % Eugenol. Zum Teil ist der Gesamtgehalt an Eugenol von der Menge des ätherischen Öles abhängig; Nelken führen 17—22, Nelkenstiele 5,8—6,7, Nelkenfrüchte 2,2—9,2 % ätherisches Öl. In glykosidischer Bindung ist Eugenol in Geum urbanum (Wurzel) beobachtet worden; dort wird es erst durch Enzyme abgespalten.

Den Eugenolnachweis mit Kalilauge führte Molisch[1]) in die Mikrochemie ein. Er brachte die Schnitte in eine völlig gesättigte Lösung von Kaliumhydroxyd. Nach kurzer Zeit schießen aus den Öltropfen Kristalle von Eugenolkalium an. Doch ist zu bemerken, daß eine möglichst konzentrierte Kalilauge angewandt werden muß. Je schwächer die Lauge, um so langsamer vollzieht sich die Kristallisation. Bisweilen entstehen die Kristalle erst nach längerer Zeit, selbst erst nach mehreren Stunden. Es sind kurze derbe Säulen und Nadeln, die überwiegend einzeln liegen. Bei Benutzung einer völlig gesättigten Lauge schießen aus frei liegenden Öltropfen sehr lange, zarte, bisweilen schwach gebogene Nadeln hervor, während die Tropfen dunkle und schaumige Beschaffenheit annehmen. Etwaige Kaliausscheidungen lassen sich durch Zusatz von Wasser und Erwärmen entfernen, Eu-

[1]) H. Molisch, Grundriß einer Histochemie d. pflanzl. Genußmittel, Jena, 1891, S. 40, 44.

genolkalium bleibt hierbei ungelöst. Besonders ölreiche Präparate von Caryophyllus geben nach einiger Zeit Kristallgarben und Büschel, die bisweilen schwach gelbliche Färbung annehmen (Fig. 81 *b*). Die Reaktion gelingt nicht nur mit Nelken und Piment (Handelsdroge), sondern selbst mit der Rinde von Sassafras officinale, dessen Öl nur wenig Eugenol enthält (Fig. 81 a).

Die anderen Reaktionen sind für Eugenol nicht beweisend. Eugenolhaltige Präparate werden, vornehmlich nach dem Anfeuchten mit Weingeist, durch Ferrichlorid tiefblau. Bei den Nelken und beim Piment färben sich nicht nur die Sekretzellen und ihr Inhalt, sondern das ganze Gewebe (nebst der Membran). Es ist hierbei zu beachten, daß sowohl die Nelken (Rosenthaler)[1]) als auch Piment (Tunmann)[2])

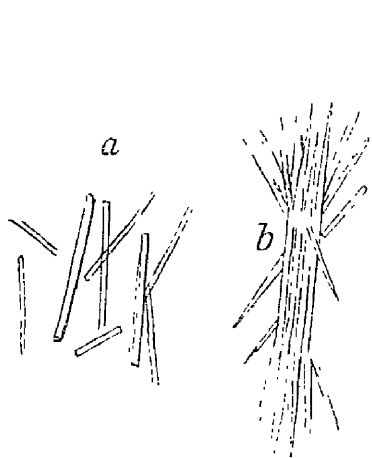



Fig. 81. Eugenolkalium, *a*) aus Sassafras officinale (Rinde), *b*) aus Eugenia caryophyllata (Droge) (Tunmann)

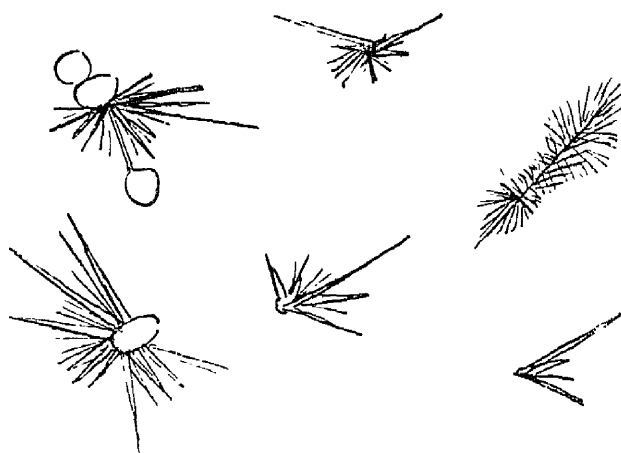



Fig. 82. Eugenol-Natrium (aus dem Sublimat des Nelkenpulvers)

einen eisenbläuenden Gerbstoff führen, der gleichzeitig in Reaktion tritt. Eugenol (also auch die eugenolführenden Ölzellen) wird ferner mit Schwefelsäure langsam blutrot, schließlich violett, dann braun, mit Salpetersäure feurig-orange bis braunrot. Beide Reaktionen besagen wenig, denn eine Anzahl öliger Sekrete geben ähnliche Farbenreaktionen; auch mit Phloroglucinsalzsäure erhält man eine Färbung.

Kristalle von Eugenolnatrium erhält man mit dem Reagens von van Urk, einer 3proz. Natronlauge, die mit Natriumbromid gesättigt wird (Pharmac. Weekbl., LXII, S. 667).

Um Eugenol im Nelkenpulver nachzuweisen[3]), ist es sicherer, das Pulver zunächst auf dem Objektträger mit Chloroform zu extrahieren.

[1]) L. Rosenthaler, Pharm. Centralh., 1908, XLIX, S. 647.

[2]) O. Tunmann, Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 29.

[3]) L. Rosenthaler, Chemische Charakterisierung von Drogen, Pharmac. Acta Helv., 1926, I, S. 72.

Bringt man dann nach dessen Verdunsten das van Urksche Reagens zwischen Objektträger und Deckglas, so entstehen am Rande sofort zahlreiche Nadeln, oft in busch- oder straußförmiger Anordnung. Sehr schön tritt die Reaktion auch ein, wenn man zuerst sublimiert und das Sublimat mit dem Reagens behandelt. Die Kristalle (Fig. 82) bilden sich dann aus den Tropfen.

Kritische Bemerkungen zum mikrochemischen Nachweis des Eugenols durch Kalilauge s. G. Erdman, Pharmazeut. Ztg., 1930, LXXV, S. 909.

Zimtaldehyd

Hauptbestandteil des Zimtöls. Flüssigkeit, die bei ca. 250° siedet.

Zum Nachweis verwendet man Phenylhydrazinhydrochlorid (in 10proz. Lösung), mit dem der Zimtaldehyd Stäbchen des Phenylhydrazons bildet. Zimtpulver extrahiert man am besten zunächst auf dem Objektträger mit Chloroform und bringt dann das Reagens zwischen Objektträger und Deckglas. Auch im Sublimat kann die Reaktion gelingen (Rosenthaler, l. c. S. 362, 3).

Kampfer

Kampfer, Laurineenkampfer kommt im Sekret der Ölzellen von Cinnamomum camphora vor. Das Sekret der Blätter und Zweige ist zähflüssig. Im Sekret älterer Achsen scheidet sich der Kampfer auch kristallinisch ab. Die Dämpfe des Kampfers durchdringen leicht die verkorkten Wände der Sekretzellen und häufen sich in Spalten und Rissen der Räume sekundär an (bis 3%), wobei sich wieder kristallinische Massen ausscheiden. Während synthetischer Kampfer sich mit Vanillinsalzsäure (P. Bohrisch, Pharm. Centralh., 1907, XLVIII, S. 527 und 777), übrigens auch mit starker Salzsäure allein (W. Lenz, Arch. d. Pharm., 1911, CCXLIX, S. 286), nicht verändert, wird der natürliche Kampfer (Handelsware) rötlich, beim Erhitzen blaugrün. Der, diese Reaktionen bedingende Körper muß aus anderen Teilen des Kampferbaumes stammen, denn die kristallinischen Kampfermassen im Gewebe geben keine Reaktion, wohl aber die Inhalte des Leitparenchyms (Markstrahlen, Rindenparenchym). Diese reagieren außerdem mit Jodreagentien. Das Sekret der jüngeren Triebe wird mit Chlorzinkjod tiefgelb, dann rotbraun, schließlich schwarz, mit Jodjodkalium oder mit Ferrichlorid schwach gelb. Vanillinsalzsäure ruft keine Farbenreaktion hervor. Es gelingt nicht, aus dem Sekret jüngerer Triebe (frisches und getrocknetes Material) den Kampfer kristallinisch zur Abscheidung zu bringen. Der Nachweis muß sich derzeit auf den Geruch beschränken; sind doch noch 0,005 μg Kampfer in 1 Liter Luft durch den Geruch wahrnehmbar. Einige Schnitte von

Blättern, die mehrere Jahre in Papier aufbewahrt waren, gaben mit Wasser befeuchtet bei der Sublimation auf der Asbestplatte mehrere unscheinbare Sublimate mit sehr kräftigem Kampfergeruch[1].

Curcumin

Curcumin, der für Curcumaarten typische Farbstoff, bildet in reinem Zustande rotgelbe Prismen, F. 183°, die in Weingeist und Äther leicht löslich sind. Die Lösungen zeigen grünliche Fluoreszenz. Der Farbstoff ist nur im ätherischen Öl. dem Sekret der Sekretzellen lokalisiert, hauptsächlich im Rhizom (Curcuma longa, viridifolia, amata), kommt nach Herrmann[2] ebenfalls im Sekret der vegetativen Teile, allerdings in geringerer Menge, vor. In den lebenden Pflanzen ist das Sekret farblos bis gelb. Bei den, mit kochendem Wasser abgebrühten Rhizomen, bei der Curcumadroge, ist das Curcumin zum großen Teile in das Parenchym übergetreten und imprägniert hierbei auch die Zellwände.

Zum Nachweis benutzt man (Herrmann) bei lebenden Objekten essigsaures Blei (ziegelroter Niederschlag), konzentrierte Schwefelsäure (orangerote), verdünnte Schwefelsäure (1+1 Wasser, karminrote), Ammoniak, Kalilauge (rotorange Färbungen). Alkohol-Schwefelsäure (1 Alkohol+3 Schwefelsäure) färbt ebenfalls rot (Linde)[3]; die Curcuminreaktionen treten auch in den Curcumadrogen auf.

Borsäure färbt erst nach dem Eintrocknen rotbraun und wurde zum Nachweis von Curcuma in Rheumpulver herangezogen[4]. Das Pulver wird mit Borsäurelösung (1 : 30), die mit etwas Salzsäure angesäuert ist, angerührt und zur Trockne gebracht, der Rückstand wird zerrieben und in Paraffin untersucht (Rheum gelb, Curcuma rotbraun). Da die Farben nicht immer gut zu unterscheiden sind, so ist es nach Tunmann vorteilhafter, den zerriebenen Rückstand zu verteilen, vorsichtig Natronlauge zuzusetzen (ohne Deckglas!) und die Einwirkung mikroskopisch zu verfolgen. Jedes Curcumapartikelchen wird tief blaugrün, jedes Rheumfragment karmoisinrot. Die blaugrüne Färbung verblaßt bald, die Curcumateile erscheinen mehr oder weniger hell, die Anthrachinonfärbung geht in Rot über und verteilt sich schließlich über das ganze Präparat.

[1] O. Tunmann, Über die Ursache der Vanillinsalzsäurereaktion des Kampfers, Schw. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1909, XLVII, Nr. 34.

[2] O. Herrmann, Nachweis organischer Verbindungen in vegetabilischen Geweben, Dissertation, Leipzig, 1876, S. 24, und A. Rosoll, Mikroch. Nachweis des Curcumins und Coniins in den vegetabilischen Geweben, 29. Jahresber. d. niederöst. Landes-Oberrealschule, Wien-Neustadt, 1894, S. 1.

[3] O. Linde, Apoth.-Ztg., 1905, XX, Nr. 47.

[4] E. Richter, Mikroskopischer Nachweis der Verfälschung von Rhabarberpulver mit Curcumapulver, Apoth.-Ztg., 1911, XXVI, S. 921.

Menthol

Menthol (Hexahydrothymol) gelangt in den Epidermaldrüsen von Mentha piperita bei Wasserentzug (Trocknen der Pflanzen, in alten Glyzerinpräparaten) in Kristallbüscheln im subkutikularen Raum zur Abscheidung (Fig. 83). Die Kristalle wurden (Flückiger-Tschirch, Grundl. d. Pharmakogn., 1884, S. 185) für Menthol angesprochen. Sie lösen sich leicht in Weingeist, Weingeist-Äther, Chloroform und Eisessig. Diese Lösungsverhältnisse besagen aber wenig. Der Beweis für die Mentholnatur der Kristalle wird erst durch die vorliegenden Nachprüfungen erbracht. Wir können nämlich die Kristalle im Öle der lebenden Pflanzen hervorrufen, wenn wir die Blätter oder Schnitte auf 10—15 Minuten unter 0° aufbewahren (künstliche Kältemischung, gleiche Teile von Ammoniumnitrat und Wasser). Bei vorsichtigem trocknen Erwärmen der Präparate lassen sie sich ohne Rückstand verflüchtigen. Die Mentholkristalle sind, wie es scheint, an sekundären Lagerstätten noch nicht beobachtet worden.

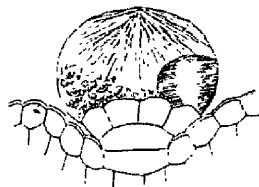



Fig. 83. Drüse von Mentha piperita mit Mentholkristallen (Tunmann)

Borneol

Im Borneokampfer und vielen ätherischen Ölen.

Hexagonale Kristalle F. 207°, Kp. 212°. Sublimiert leicht. Schwer in Wasser, leicht in Weingeist u. dgl. löslich.

Aus seiner Lösung in Ligroin kristallisieren mit Brom flache Nadeln, die lebhaft polarisieren, gerade auslöschen und Dichroismus (farblos-gelb) zeigen. Zum mikrochemischen Nachweis eignet sich auch die Verbindung mit Ferricyanwasserstoffsäure. Man kann sie auf dem Objektträger erhalten, indem man zu der Lösung des Borneols in einem kleinen Tropfen Benzol die Lösung der Ferricyanwasserstoffsäure[1]) hinzufügt und mit einem Deckglas bedeckt.

Svensson[2]) erhielt ein Sublimat aus Borneol, als er Pulver der Baldrianwurzel nach Befeuchten mit 2 n-Natronlauge der Mikrosublimation unterwarf. Das flüssige Sublimat kristallisierte nach einigen Stunden in sternähnlichen Aggregaten und gab die Reaktion mit Ferricyanwasserstoffsäure.

Ebenso verlief der Versuch mit Radix serpentariae und Gemmae pini.

[1]) Man läßt ein Gemisch von 2 Teilen Kaliumferricyanid, 5 Teilen Wasser und 6 Teilen konz. Salzsäure stehen, bis es keine Kristalle mehr absetzt.

[2]) Sven Svensson, Mikrosublimationsförsök med rhizoma valerianae, Farmacevtisk Revy, 1928, No. 50.

Citral

Citral ist der Hauptbestandteil des Zitronenöls und kommt noch in vielen anderen ätherischen Ölen vor. Zitronenartig riechende Flüssigkeit.

van Eck[1]) benutzte zum Nachweis, die Gelbfärbung, die Citral mit einer Lösung von Benzidin in Eisessig gibt und beobachtete diese Färbung in den Sekretbehältern frischer Zitronenschalen.

Methysticin

In der Wurzel von Piper methysticum Forster wurde 1888 von C. Pomeranz[2]) ein stickstofffreier, in gelben Nadeln kristallisierender Körper gefunden, das Methysticin (Kawain) F. unscharf zwischen 133° u. 141°.

Methysticin ist nur im Inhalte der Ölzellen lokalisiert und läßt sich bereits mit 0,003 g Substanz (Pulver oder Schnitte der Wurzel) mikrochemisch in kristallinischer Form zur Anschauung bringen, indem man ein Präparat in absoluten Alkohol einlegt. Schon nach teilweiser Verdunstung des Alkohols scheiden sich am Deckglasrande zahlreiche prismatische Nadeln aus (120—160 μ lang, 15 μ sichtbare Breitenfläche), die bei gewöhnlicher Belichtung gelb sind, in rotviolett bis gelb polarisieren und sich in Schwefelsäure mit violetter Farbe lösen (Fig. 84a). Wird ein Präparat mit Kalilauge gekocht und nach teilweiser Verdunstung der Flüssigkeit verdünnter Weingeist (Weingeist und Wasser zu gleichen Teilen) zugefügt, so schießen aus den dunkelbraunen Harzballen gebogene, bis 1 mm lange, ungemein zarte Nadeln hervor, die braunrot polarisieren, sich in Essigäther lösen und die Kaliverbindung der Methysticinsäure darstellen (Fig. 84b). Im grüngelben homogenen Mikrosublimat ist ebenfalls Methysticin zugegen, welches mit Schwefelsäure, Salzsäure, Salpetersäure eine Reihe rötlicher Farbenreaktionen gibt. Außerdem erhält man in der Lösung des Mikrosublimates in weingeistiger Kalilauge bei Zusatz von Salzsäure eine zitronengelbe Fällung (Tunmann)[3]).

Fig. 84. a) Methysticinkristalle aus Piper methysticum (Wurzel, Schnitte) mit Alkohol erhalten b) Methysticinsäure mit Kalilauge-Alkohol (Tunmann)

[1]) P. N. van Eck, Benzidin als Reagens auf Aldehyde, Pharmaceut. Weekblad, 1923, LX, S. 1204, nach Jahresber. d. Pharmazie, 1923, S. 137.

[2]) Chemische Literatur bei E. Winzheimer, Beiträge zur Kenntnis der Kawawurzel, Arch. d. Pharm., 1908, CCXLVI, S. 338.

[3]) O. Tunmann, Beiträge zur Mikrochemie einiger Wurzeldrogen, Kawa-Kawa, Gehes Berichte 1912, S. 179.

Podophyllum-Stoffe[1])

In der Wurzel von Podophyllum peltatum L. kommt Harz in besonderen Sekretzellen vor, deren Inhalt durch Kalilauge rötlich, durch Millons Reagens braunschwarz, durch Kupferazetat dunkelbraun wird. In den Parenchymzellen findet sich das bitter schmeckende Podophyllotoxin. Auf seiner Gegenwart beruhen folgende Reaktionen: Konzentrierte Schwefelsäure, auch in Verbindung mit Ferrichlorid, Eisessig u. a. färbt sofort das gesamte Parenchym kräftig grüngelb. Konzentrierte Salpetersäure ruft vorübergehende Rotfärbung hervor. Salzsäure färbt dauernd gelb. Kaliumquecksilberjodid bewirkt gelbgrauen flockigen oder kleinkörnigen Niederschlag, der in der äußeren Rinde am stärksten ist. In denselben Zellen kommt nach Tunmann das Podophylloquercetin vor. Podophyllotoxin läßt sich bei etwa 200° sublimieren.

Santonin

Santonin ist bisher nachgewiesen in Artemisia cina (Berg) Willkomm, A. mexicana Willd, A. neo-mexicana Wooton, A. brevifolia Wallich (A. maritima [L.] Hooker) und A. coerulescens.

Glänzende rhombische Blättchen F. ca. 170°. Bei weiterem Erhitzen unzersetzt sublimierbar. Schwer löslich in Wasser, leichter in Weingeist, Methanol und Chloroform, schwer in Äther. Auch in Ätzalkalien löslich (als Salze der Santoninsäure) und aus der Lösung wieder durch Säuren fällbar.

Artemisia cina enthält in den Blüten bis 2,6 % Santonin, viel in den Samen, relativ weniger in den Blütenstielen, nichts in den anderen Organen (Herndlhofer).

„Wenn man die Blütenköpfe der Droge mit Wasser durchfeuchtet und mit der Nadel auseinanderlegt, so findet man kleine Kristallsplitter, welche nach ihrem Verhalten zu Lösungsmitteln als Santonin betrachtet werden dürfen" (Flückiger)[2]). Nach A. Meyer[3]) kommen diese Kristalle „vorzüglich in den Drüsen oder neben denselben vor" und lösen sich in Alkohol, Äther und Natronlauge. Tschirch und Oesterle[4]) sagen, „daß das Santonin nur in den Öldrüsen entsteht" und daß die Kristalle sich mit alkoholischer Natronlauge rot färben „unter gleichzeitiger Bildung von Santoninnatriumnadeln". Die besten Kristalle sieht man den Flügeln der Hüllkelchblätter aufliegen; sie werden bis 60 μ lang; die typischen rhombischen Täfelchen sind meist 40 μ lang

[1]) O. Tunmann, Zur Morphologie und Mikrochemie von Podophyllum peltatum L., Pharmaz. Centralh., 1914, LV, S. 619.

[2]) F. A. Flückiger, Pharmakognosie, 1881, S. 780.

[3]) A. Meyer, Wiss. Drogenkunde, 1892, S. 312.

[4]) Anatom. Atlas, 1900, S. 316.

und 15 μ breit (Fig. 85 a); sie leuchten bei gekreuzten Nicols nur grau auf. In Sodalösung lösen sie sich erst beim Erwärmen und farblos auf. Weingeistige Natronlauge ist weder zum Nachweis der Kristalle noch zum Santoninnachweis im Gewebe geeignet. Die Rotfärbung, die Santonin mit diesem Reagens gibt, ist bei Mengen unter 0,001 g unter dem Mikroskop nicht zu erkennen[1]) und erfolgt bei größeren Mengen erst beim Erhitzen. Die bei Benutzung von Schnitten mit weingeistiger Natronlauge ausfallenden Kristalle sind zum Teil fremde Körper oder stammen zum Teil aus dem Reagens (Sphärite). Reines santoninsaures Natrium kristallisiert aus Weingeist in flachen Täfelchen, die man in den Präparaten nicht oder doch nur selten und dann in Zerrformen bemerkt. Die mit der Lauge eintretende Färbung (gelborange bis rötlich), die vorzüglich in den Sezernierungszellen der Drüsen und im Leitparenchym erfolgt, ist ebenfalls nicht eindeutig, denn ein Muster, das aus Köpfchen mit teilweise geöffneten Blüten bestand (von dem es noch fraglich bleibt, ob überhaupt Köpfchen der echten Artemisia cina vorlagen) und welches nach dem makrochemischen Befunde von Prof. Heyl-Darmstadt keine Spur von Santonin enthielt, gab mit weingeistiger Natronlauge ebenfalls eine tief orangegelbe Färbung. Diese Köpfchen enthielten nicht die typischen Santoninkristalle.

Fig. 85. Artemisia cina (Droge). Santoninkristalle, *a*) einem Hüllkelchblatt aufgelagert, *b*) in einem 14 Tage alten Sublimat (Tunmann)

Besser eignet sich zum direkten Nachweis Natriummethylat[2]). Man bringt einige Hüllblättchen und Blütchen in einen großen Tropfen des Reagens, bedeckt mit Deckglas und erhitzt über kleiner Flamme zum einmaligen Aufkochen. Die Drüsen erscheinen dann bei mikroskopischer Betrachtung lebhaft ziegelrot (Gilg und Schürhoff)[3]).

Man kann diese Reaktion auch in folgender Weise zum Nachweis benutzen: Man befeuchtet ein wenig des grob gepulverten Materials auf dem Objektträger mit ein wenig Wasser, bedeckt mit dem Deckglas und läßt bei leicht schief gestelltem Objektträger Chloroform

[1]) Ein Blütenköpfchen dürfte höchstens 0,02—0,03 mg Santonin enthalten.

[2]) Man trägt 10 g zerschnittenes metallisches Natrium unter Kühlung oder am Rückflußkühler in 50 g Methanol ein.

[3]) E. Gilg und P. N. Schürhoff, Apotheker-Ztg., 1927, XLII, Nr. 47.

zwischen diesen und das Deckglas treten. Nach dem Verdunsten des Chloroforms befeuchtet man die Randschichten mit Natriummethylat, worauf bei Gegenwart von Santonin eine stark orangerote Färbung auftritt.

Zum Nachweis des Santonins in pflanzlichem Material kann die Sublimation verwendet werden, wenn auch das Sublimat direkt nur langsam kristallisiert.

Drei zerdrückte Blütenköpfchen lieferten unscheinbare Sublimate; aus den Tröpfchen schieden sich nur selten und relativ wenige Kristalle aus. Bleiben die Sublimate 14 Tage der Ruhe überlassen, dann hat sich ein dichter Rasen gebildet, an dessen Peripherie schöne bis 70 μ lange, Santoninkristalle hervorragen (Fig. 85b). Es sind übereinander gelagerte Täfelchen und Balken. Vielfach sind die Kristalle nur an einem Ende gut entwickelt. Die Kristallisation durch Chloroform zu beschleunigen hat wenig Erfolg.

Herndlhofer[1]) extrahiert erst mit einigen Kubikzentimetern Benzol in einem kleinen Rückflußkühler, filtriert ab und läßt das Filtrat abdunsten. Der Rückstand wird im Klein-Wernerschen Mikrosublimations-Apparat sublimiert und das Sublimat am Deckglas mit Benzol umkristallisiert.

Die Identifizierung des Sublimats erfolgt mit Natriummethylat oder Jodjodwasserstoffsäure. Zur Verwendung des ersteren erwärmt man den das Sublimat tragenden Objektträger und gibt das Reagens, so lange es noch warm ist, dazu. Man erhält dann die oben erwähnte Rotfärbung (Gilg und Schürhoff).

Mit Jodwasserstoff entstehen grünliche oder grünbraun durchscheinende, grünviolett dichroitische Würfel oder Platten, auch Zerrformen F. 113°.

Kautschuk

Kautschuk ist ein Bestandteil des Milchsaftes der Pflanzen. Reich an Kautschuk sind Artocarpeen, Apocyneen, Euphorbiaceen, Campanulaceen, Compositen, Moraceen u. a. Die Pflanzen unserer Zone führen nur geringe Mengen. Der aus Pflanzen gewonnene Rohkautschuk besteht aus dem Reinkautschuk und anderen Anteilen des Milchsaftes (Eiweiß, Fett, Farbstoff, Harzen, anorganischen Salzen).

Kautschuk ist nach Staudinger ein Gemisch von Polyprenen=Polymer-Homologen des Isoprens.

Mit Hilfe des Mikromanipulators stellte Hauser[2]) fest, daß der Latex von Ficus elastica eine wahre Emulsion ist, während die dispergierte Phase des Hevea-Latex aus zwei verschieden konsistenten Phasen besteht.

[1]) E. Herndlhofer, Der histochemische Nachweis des Santonins, Mikrochemie, 1927, V, S. 21.

[2]) E. A. Hauser, Über die Anwendung des Mikromanipulators und anderer

Die Kautschukteilchen des Milchsaftes von Hevea brasiliensis sind ei- oder birnförmig oft mit langen Schwänzen, die von Manihot stäbchenförmig, die von Ficus elastica und Castilloa elastica ungefähr kugelig.

Im Milchsaft von Manihot Glaziovii fand Zimmermann: „drei verschiedene Arten von Inhaltskörpern — lange Stäbchen, winzige Kugeln und größere körnige, meist kugelförmige Körper. Der Masse nach überwiegen bei weitem die stäbchenförmigen Körper, deren Dicke jedenfalls unter 1 μ liegt. Sie sind auch sicherlich als die den Kautschukkügelchen der anderen Kautschukpflanzen entsprechenden Gebilde aufzufassen und lagern sich bei der Koagulation zu netzartigen Massen zusammen. Ob die im Milchsaft enthaltenen kleinen Kügelchen ebenfalls aus Kautschuk bestehen, vermag ich nicht anzugeben. Die größeren körnigen Körper färben sich mit Jodlösung intensiv gelb bis braun und sind vielleicht als Zellkerne zu deuten". Diese verschiedenen Bestandteile erscheinen nicht gleichzeitig im Ausfluß (Tobler).

Nach A. Meyer[1]) sind die „Emulsionsante" des Milchsaftes von Ficus elastica homogene Tropfen von 1,5—5 meistens 3,5 μ Durchmesser. Setzt man zu dem mit Wasser verdünnten Milchsaft Weingeist, so werden die Tropfen bis auf einen körnigen in Benzol löslichen Rest gelöst. Chloral (2 : 5) löst bis auf einen sehr kleinen Rest. Mit Kupferazetat entsteht im Dispersionsmittel ein feinkörniger Niederschlag; die Tropfen verändern sich nicht. Weingeistige Kalilauge greift die Tropfen unregelmäßig an; sie werden teilweise unregelmäßig konturiert und körnig. Mit Sudanglyzerin kleben die Tropfen durch den Weingeistgehalt des Reagens sofort zusammen und färben sich rot.

Der Kautschuk ist erst von einem gewissen Alter der Organe an und nur bis zu einer bestimmten Periode reichlich, der Gehalt daran steigt bis zu einem in der lebhaftesten Wachstumsperiode des Organs liegenden Maximum, um dann wieder abzunehmen.

Die Blätter mehrerer milchsaftführender Pflanzen werden von Schnecken gefressen. Ausnahme Mascarenhasia elastica, bei der die mit nichtmilchigem Saft versehenen Blätter gefressen wurden, die anderen nicht[2]).

Der Milchsaft der Convolvulaceen dient nach Czapek[3]) der Ernährung, für den der Sekretzellen von Exogonium purga hat jedoch Tunmann[4]) gezeigt, daß er ein Exkret ist.

neuer optischer Instrumente bei mikroskopischen Studien an Kautschukmilchsäften in den Tropen, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1924, XLI, S. 465.

[1]) A. Meyer, Morphologische und physiologische Analyse der Zelle usw., S. 398.

[2]) F. Tobler, Zur Physiologie des Milchsaftes einiger Kautschukpflanzen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1913, XXXI, S. 617.

[3]) Fr. Czapek, Zur Kenntnis des Milchsaftsystems der Convolvulaceen, Sitzgsber. Wien. Akad., 1894, CIII, S. 87.

[4]) O. Tunmann, Über Jalapenknollen, Apoth.-Ztg., 1916, XXXI, S. 263.

Über die Physiologie und Ökologie der Milchsäfte läßt sich offenbar nichts Allgemeines aussagen. Tobler fand bei Mascarenhasia elastica, daß bei Mangel an N der Kautschukgehalt im Gegensatz zum Gehalt an Eiweißsubstanzen eher zunahm, während er bei Manihot Glaziovii abnahm.

Der Milchsaft von Mascarenhasia elastica und Manihot Glaziovii enthält nach Tobler[1]) Stoffe, besonders Eiweißkörper, die bei Mangel an plastischem Material verbraucht werden und von den Bereitungsstellen aus in den Milchsaft gelangen. Der Kautschuk ist wahrscheinlich ein Exkret.

Milchsaftbehälter können als Kalkspeicher dienen; das Fehlen oder Zurücktreten von Kalziumoxalat in Milchsaftpflanzen ist eine häufige Erscheinung (Onken)[2]).

Fast alle Milchsäfte reagieren sauer. Nitrate sind in ihrer Mehrzahl nicht vorhanden; wo sie vorhanden sind, wie bei den Papaveraceen tritt ihr Kalkgehalt zurück (Onken).

Die Pflanze benützt wahrscheinlich den Milchsaft beim Welken als Wasserreservoir (Klein u. Pirschle).

Nach Versuchen von Simon[3]) sind die Milchröhren wahrscheinlich nicht als Leitungsorgane anzusehen. Zu den Versuchen wurden die Pflanzenstengel unter Wasser abgeschnitten und etwa 4 cm in eine Farbstofflösung 1 : 10 000 für mehrere Tage eingetaucht. Zur Färbung des Milchsaftes war besonders Rose bengale (Tetrajodtetrachlorfluoreszein-Kalium) geeignet.

Roeben[4]) findet in Übereinstimmung mit den Anschauungen von Simon, daß in milchröhrenhaltigen Rindenteilen, die teilweise vom Holzkörper losgelöst waren, kein Auf- oder Abstieg dargebotenen Farbstoffs oder Lithiums erfolgte. Sie kommt zu der Ansicht, daß dem Milchsaft Speicherfunktion zukommt, daß aber nur ein Teil seiner Stoffe dauernd aus dem Stoffwechsel ausgeschaltet ist. Das Milchröhrensystem scheint durch reversible Substanzabgabe eine Bedeutung für die osmotische Regulation zu besitzen.

Im polarisierten Lichte zeigen die Kautschukkörnchen ein verschiedenes Verhalten. Hevea- und Castilloa-Kautschuk brechen das Licht nicht. Der Kautschuk von Parameria und der Hippocrateaceen zeigt nach Fritsch[5]) lebhafte Doppelbrechung, die durch heiße Kalilauge oder Kochen mit Wasser vorübergehend aufgehoben wird. Hippo-

[1]) F. Tobler, Physiologische Milchsaft- und Kautschukstudien, Jahrbücher für wiss. Bot., 1914, LIV, S. 264.

[2]) A. Onken, Über die Bedeutung des Milch- und Schleimsaftes für die Beseitigung des überschüssigen Kalziums, Bot. Archiv, 1922, II, S. 281.

[3]) C. Simon, Sind die Milchröhren Leitungsorgane? Diss. Münster, 1917, Beih. z. bot. Centralbl. 1918, XXXV, S. 183.

[4]) M. Roeben, Studien zur Physiologie des Milchsaftes, Jahrbücher f. wissenschaftl. Botanik, 1928, LXIX, S. 587.

[5]) F. E. Fritsch, Untersuchungen über das Vorkommen von Kautschuk bei den Hippocrateaceen, verbunden mit einer anat. system. Unters. von Blatt und Achse bei derselben Familie, Bot. Centralbl., Beih., 1901, XI, S. 283.

crateaceen-Kautschuk wird von Weingeist oder Äther nicht verändert. von Schwefelsäure und Osmiumsäure geschwärzt, von Chloroform und Benzol bis auf geringe Reste gelöst und kann durch Erwärmen auf dem Objektträger verflüchtigt werden. Körnchen von den gleichen Reaktionen kann man aber nach Fritsch auch allenthalben in den Palisaden und den Zellen der Epidermis antreffen. Die Kautschuktröpfchen von Ficus lösen sich in Äther, Benzol, Schwefelkohlenstoff, quellen in Chloralhydrat, färben sich mit Alkanna, sind aber unlöslich in Wasser, Glyzerin, verdünnten Säuren und Alkalien. — Die Guttaperchasubstanz der Sapotaceen löst sich leicht in Xylol[1]). Verfügt man über lebendes Material, dann ist die Analyse eines frisch ausgetretenen Tropfens des Milchsaftes anzuraten.

Über die Bildung des Kautschuks liegen wenige Untersuchungen vor. In den Früchten von Struthanthus und Phthirusa (Loranthaceen) entsteht er nach Iltis[2]) im Inhalte der Parenchymzellen, die auch in der reifen Frucht Zellkern und Plasmaschlauch aufweisen. Die Wandungen dieser, in jungen Früchten Milchsaft führenden Kautschukzellen beteiligen sich nicht an der Bildung.

Beim Studium über Verteilung der Milchröhren bedarf es häufig größerer Präparate, die naturgemäß dicker sind. Um in solchen die Milchröhren gut sichtbar zu machen, wird man die verschiedenen Bestandteile des Milchsaftes, vorzüglich den Kautschuk, benutzen. Die Schnitte werden bis mehrere Tage mit (eventuell verdünntem) Eau de Javelle behandelt, stärkereiche Objekte werden mit verdünntem Chloralhydrat mazeriert, vertragen meist auch ein Erwärmen. Stets bleibt genügend Milchsaft zurück, der bei nachfolgender Alkanninfärbung ein Auffinden der Milchröhren gestattet. In anderen Fällen können die übrigen Inhalte zur Sichtbarmachung dienen (s. Ferulasäure, S. 325). Die Milchröhren der Lactarius- und Russula-Arten weisen Arnould und Goris[3]) mit Vanillinschwefelsäure nach (blaue bis rötliche Färbung; Vanillin 0,25 g, Wasser und Schwefelsäure je 2 Vol.). Die Ursache der Reaktion wird nicht angegeben. Vielleicht beteiligen sich Indol und Skatol hierbei.

Nach Fietz läßt sich der Inhalt der Milchsaftröhren, wie der der Gerbstoffzellen (vgl. S. 378) durch Formalin fixieren.

[1]) A. Charlier, Contributions a l'étude anatomique des plantes à guttapercha et d'autres Sapotacées, Journ. de Bot., 1905, XIX, S. 127.

[2]) H. Iltis, Über das Vorkommen und die Entstehung des Kautschuk bei den Kautschukmisteln, Anz. Wien. Akad., 1911, X, S. 181.

[3]) L. Arnould et A. Goris, Sur une réaction colorée chez les Lactaires et les Russules, Compt. rend., 1907, CXLV, S. 1199.

Die Mikrochemie des Kautschuks ist noch recht lückenhaft, es erscheint noch fraglich, ob die als Kautschuk angesprochenen Bildungen verschiedener Pflanzen untereinander identisch sind. Dann muß auch hier, wie bei so vielen Stoffen, (S. 354, 4), betont werden, daß der Kautschuk des ausgeflossenen Milchsaftes und des technisch gewonnenen Produktes nicht mit jenen im mikroskopischen Bilde als Kautschuk gedeuteten Kohlenwasserstoff-Gebilden übereinstimmen kann. Die Unterschiede werden in den Reaktionen zum Ausdruck kommen. Folgender Gang wäre vorzuschlagen. Die Schnitte (wenn möglich aus frischem oder in geeigneter Weise fixiertem Material) werden gewässert und dann 5—6 Tage mit 50proz. und ebenso lange mit absolutem Alkohol mazeriert. Gummi, Schleime, Harze, ätherische Öle, Fette werden zum größten Teile gelöst sein (Äther läßt sich nicht allgemein zur Entfettung benutzen, Alkaloide können durch Weinsäure-Weingeist entfernt werden). Jedenfalls besteht der Milchröhren-Inhalt nun der Hauptsache nach aus Plasma-Eiweiß und Kautschuk. Letzterer muß sich in Chloroform lösen, Alkannin (S. 353), Carmin, Anilinfarbstoffe u. a. speichern, von verdünnten Säuren und Alkalien (Unterscheidung von Fetten) nicht angegriffen werden. Über den Nachweiß des beim Erwärmen zurückbleibenden Eiweiß s. Eiweiß. Die Lösungsverhältnisse der Kautschuktröpfchen werden nicht immer übereinstimmen. Azeton sowie Trichloressigsäure (auch verdünnte) bewirken Koagulation, ebenso andere Eiweißfällungsmittel (s. Eiweiß).

Zimmermann[1]) empfiehlt zum Nachweis des Kautschuks eine Lösung von Alkannin in einem Gemisch von gleichen Volumen Weingeist, Glyzerin und Wasser. Man läßt einige Zeit einwirken, wenn nötig unter Erwärmung.

In jungen Milchsaftröhren der Blumenblätter von Chelidonium wies Popovici[2]) mit Hilfe einer doppelten Vitalfärbung mit Neutralrot und Indophenolblau Harztröpfchen im Plasma nach.

Gerbstoffe (Tannide)

Als Gerbstoffe fassen wir stickstofffreie, wasser- oder weingeistlösliche Stoffe mit aromatischen OH-Gruppen zusammen, die adstringierenden Geschmack besitzen, meist tierische Haut gerben, Eiweiß, Gelatine und Alkaloide fällen und meistens durch Oxydation amorphe, schwer lösliche Phlobaphene liefern. In den lebenden Zellen werden jedenfalls viele Gerbstoffe in Verbindung mit Zuckern auftreten. Sie kommen im ganzen Pflanzenreiche und in allen Teilen der Pflanzen vor. Durch hohen Gehalt an Gerbstoff zeichnen sich die Gallen (pathologische

[1]) A. Zimmermann, Der Manihot-Kautschuk, Jena 1913.

[2]) H. Popovici, Contribution á l'etude cytologique des laticifères, Compt. rend. Acad. sciences Paris, 1926, CLXXXIII, S. 143.

Gerbstoffe) aus (Aleppo-Gallen 58, chinesische 60—75, deutsche 14—17 %), ferner viele Rinden von Bäumen und Wurzeln (physiologische Gerbstoffe, Betula 2, Fraxinus 3, Larix 10, Alnus 20 %), verschiedene Hölzer (Juglans 5, Quebracho colorado 20—30 %), Samen und Früchte (Punica granatum, Fruchtschale 28, Areca catechu, Samen 18 %, Caesalpinia-Arten, Hülsen 30—60 %), die Laubblätter von Thea und Rhus-Arten. Lichtblätter sind gehaltreicher als Schattenblätter. Lichtabschluß verhindert die Gerbstoffbildung. Im Dunkel erwachsene Kastanien enthalten weniger Gerbstoff als am Licht gewachsene (Michel-Durand).

Nach Lloyd[1]) findet sich Gerbstoff in der lebenden Zelle in zweierlei Form: 1. im Zellsaft gelöst, 2. in chemischer Verbindung oder wenigstens an zellulose-ähnliches Kolloid adsorbiert. Dadurch wird das Plasma gegen die fällende Wirkung der Gerbstoffe geschützt.

Huber[2]) bestätigt das von Lloyd beobachtete Auftreten einer Adsorptionsverbindung von Gerbstoff und Kohlenhydrat.

Dekker[3]) fand in Arten von Ribes, Rhododendron, Rosa und Kentia Gerbstoff immer in den Begleitzellen des Phloems. Gewebeschichten, denen in diesen Gattungen eine Schutzrolle zukommt, sind stets gerbstoffhaltig: In jüngeren Schichten die Epidermis und die angrenzenden Schichten, in älteren Stengeln und Wurzeln ein Teil des Korkgewebes. Gerbstoffhaltig ist noch das Phloembündel an der Außenseite des Kambiums. Kambiumzellen, die Holz- oder Siebelemente liefern, sind stets gerbstofffrei, die in den Markstrahlen liegenden enthalten vielfach Gerbstoff. Die breiten Markstrahlen enthalten nur in den beiden Außenreihen Gerbstoffe. Im Mark und der Außenrinde der jüngeren Stengel finden sich Gerbstoffbahnen; die im Mark sind von Bedeutung beim Transport reduzierender Zucker.

An Stellen mit besonderen Lebensfunktionen können Gerbstoffanhäufungen stattfinden: in einer in vollem Wachstum befindlichen Stengelspitze, in einer Knospe, an der Stelle, wo ein Seitenzweig oder eine Wurzel angeheftet ist. Hier findet sich außerdem häufig Kalziumoxalat.

Die Gerbstoffe sollen wie die Anthocyane in Mitochondrien entstehen (Guilliermond).

„In elektrischer Beziehung ist der „Gerbstoffhorizont", wie ihn Sperlich nennt, dadurch ausgezeichnet, daß er ein auffallend positives Plasma enthält,

[1]) Lloyd, The association of tannin with an emulsion colloid in the acorn (Quercus laurifolia), John Hopkins Univ. Circ., Febr. 1912. Vgl. dazu Michel-Durand, De l'état des tannins dans la cellule végétale. Compt. rend. Acad. sciences, Paris, 1924, CLXXVIII, S. 586.

[2]) H. Huber, Über den Zustand der Gerbstoffe in der Zelle (Vorläufige Mitteilg.), Act. Soc. helv. Sc. nat., 1928, CIX, S. 187.

[3]) J. Dekker, De beteekenis van looistoff voor het plantenlichaam, Pharmac. Weekbl. 1916, LIII, S. 1477.

das in oberirdischen Pflanzenteilen sonst nur noch in Geleitzellen, Eizellen, Schleimzellen und Alkaloidzellen vorkommt[1])."

Am Hochspannungsmodell hat es sich gezeigt, „daß Tannin nicht nur scharf anodisch ist, sondern auch schon in kleineren Mengen basische Farbstoffe — offenbar durch Adsorption — zur Wanderung nach der Anode veranlaßt. Wir haben also in den Gerbstoffen eines jener Protoplasmakolloide der Pflanzenzelle vor uns, die den Unterschied zwischen dem physikalischen und biologischen Wanderungssinn erzeugen."

Über das Vorkommen von Gerbstoffen in Pflanzen und deren Geweben liegen außerordentlich zahlreiche Angaben vor. Außer auf das Buch von J. Dekker. Die Gerbstoffe Gebr. Borntraeger, Berlin) sei etwa noch auf folgende Arbeiten verwiesen:

A. Müller, Beiträge zur Kenntnis des Baus und der Inhaltsstoffe der Kompositenblätter, Diss. Göttingen 1912.

E. Wissemann, Beiträge zur Kenntnis des Auftretens und der topographischen Verteilung von Anthocyan und Gerbstoff in vegetativen Organen. Diss. Göttingen, 1911.

H. Martin, Beiträge zur Kenntnis der Anatomie und der Inhaltsstoffe der Farne, Diss. Göttingen, 1916.

F. W. Siburg, Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe in den Gelenken der Leguminosen und Oxalideen, Diss. Göttingen, 1913.

G. Eckmann, Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe in den Gelenken, Diss. Göttingen, 1916.

N. Hamorak, Über das Vorkommen von Gerbstoffen in der Nähe der Spaltöffnungen, Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss. Math. naturw. Kl. Abt. I, 1915, CXXIV, S. 447.

Gemäß der verschiedenen Zusammensetzung der Gerbstoffe ist es wohl ausgeschlossen, daß ihre biologische Bedeutung in allen Fällen dieselbe ist. Oft — so in den Borken — werden sie als Exkrete zu betrachten sein.

Gerbstoffe sollen in der gemäßigten Zone als Schutzmittel gegen Frost dienen; sie sollen allgemein gegen Tiere und Pilze Schutz verleihen (Mc. Nair).

(I. B. Mc. Nair, Gum, tannin and resin in relation to specificity, environment and function, Amer. Journ. of Botany, 1930, XVII, S. 187).

Nach Arnhold[2]) stehen Gerbstoffe zur Atmung in Beziehung, wobei sie in Fett und in eine aromatische Verbindung übergeführt werden. Hierfür sprechen die Atmungsquotienten. Stahl[3]) faßt sie als ein Schutzmittel gegen Tierfraß, Kraus[4]) auch gegen Fäulnis, auf. Nach Warming verringern sie ein Austrocknen

[1]) R. Keller, Neues von der Protoplasma-Elektrizität, Protoplasma 1926/1927, I, S. 313.

[2]) W. Arnhold, Über das Verhalten der Gerbstoffes bei Gunnera, Kieler Dissertation, 1911.

[3]) E. Stahl, Pflanzen und Schnecken, Jena 1888.

[4]) G. Kraus, Grundlinien zu einer Physiologie des Gerbstoffes, Leipzig 1889.

der Rinde. Der Zucker der glykosidischen Gerbstoffe kann gelegentlich als Nahrstoff in Betracht kommen[1]. Bei Spirogyren beteiligt sich der Gerbstoff an der Bildung der Zellwand (van Wisselingh, l. c.). Doch ist er sicher kein echter Reservestoff. Albo[2] hat ihn als Nahrstoff hingestellt und mit der Stärkebildung in Verbindung gebracht. Meist werden die Gerbstoffe Endprodukte des Stoffwechsels sein.

Sperlich[3] fand — in guter Übereinstimmung mit Befunden G. Bertholds[4] und seiner Schule — daß innerhalb einer Pflanze, zu deren Organisation die Speicherung von Gerbstoff und Stärke gehört, beide Stoffe in der Regel nicht in einer und derselben Zelle aufgespeichert werden, daß in pflanzlichen Geweben, die aus gerbstoff- und stärkeführenden Zellen zusammengesetzt sind, Speicherung und Abbau der beiden Stoffe sehr häufig parallel laufen und daß in inhaltlich homogenen Geweben oder Gewebezonen im Laufe der Entwicklung der eine Stoff dem anderen das Feld räumt.

Beim Keimen der Samen von Quercus ballota scheint die Gesamtgerbstoffmenge in Keimling + Kotyledonen etwas zuzunehmen. In den Kotyledonen nimmt dagegen der absolute Gehalt um etwa 30 % ab[5].

In den Blättern von Carpinus betulus fand Niethammer[6] nach Ablauf von Sonnentagen nicht mehr Gerbstoff in den Zellen als nach Regentagen. Sie sind in allen Zeitpunkten der Vegetationsperiode vorhanden und können im Blatt wandern.

Der Gerbstoffgehalt in den Rinden von Kastanien soll im Sommer, d. h. in der Zeit lebhaftester Zelltätigkeit Neigung zur Verminderung zeigen (de Dominicis und Spataro)[7].

Die Gerbstoffbläschen, die in Vakuolen des Plasmas auftreten, sind stark lichtbrechend und treten bei Algen gewöhnlich als zahlreiche

[1]) W. Pfeffer (s. auch Lebendfärbung).

[2]) G. Albo, L'azione del tannino sulla germinazione e sullo sviluppo del Solanum tuberosum, N. Giorn. bot. ital., 1904, XI, S. 521.

[3]) A. Sperlich, Jod, ein brauchbares mikrochemisches Reagens für Gerbstoffe, insbesondere zur Darstellung des Zusammenhangs der Verteilung von Gerbstoff und Stärke in pflanzlichen Geweben, Ber. deutsch. bot. Ges., 1917, XXXV, S. 69.

[4]) G. Berthold, Untersuchungen zur Physiologie der pflanzlichen Organisation, Leipzig 1898 u. 1904.

[5]) Hanna Huber, Über den Zustand und die Rolle der Gerbstoffe in der Pflanze, Jahrbücher f. wissensch. Bot., 1929, LXX, S. 278.

[6]) A. Niethammer, Histochemische Untersuchungen über Gerbstoffe im Blatte von Carpinus betulus zu verschiedenen Zeitpunkten, Biochem. Zeitschr., 1929, CCXVI, S. 462.

[7]) Über die biologische Bedeutung der Gerbstoffe. Schwankungen des Tanningehaltes der Kastanienbaumrinde in den verschiedenen Monaten und Jahreszeiten, Staz. sper. agrar. ital., 1919, LII, S. 305; nach Chem. Centralbl., 1920, XCI, I, S. 429.

kleine Gebilde auf, während sie in den Zellen der höheren Pflanzen ganz bedeutende Größe erreichen können.

Beim Absterben der Zellen werden die Gerbstoffe zum Teil von den Membranen gespeichert; in getrockneten Pflanzen bilden sie mit dem Protoplasten formlose Klumpen.

In Weingeistmaterial fallen Gerbstoffzellen oft durch ihre gelbbraune Färbung auf.

In einzelnen Fällen haben die Gerbstoffzellen gleichzeitig den Charakter von Farbstoffzellen. So enthalten nach Baumgärtel[1]) die Farbstoffzellen derjenigen Formen von Ricinus communis, die rot gefärbte Teile besitzen, einen Farbstoff mit Tannidcharakter.

In der Epidermis der reifenden Frucht von Gunnera chilensis enthält fast jede Epidermiszelle je einen verhältnismäßig großen kugeligen unregelmäßig knollen- oder traubenförmigen Inhaltskörper, der entweder farblos oder mehr oder minder intensiv rot gefärbt ist. Es handelt sich um einen Gerbstoffkörper „Anthocyanophor", der durch aus dem Zellsaft aufgenommenes Anthocyan rot gefärbt ist[2]).

Beim mikrochemischen Nachweis der Gerbstoffe stehen die Reaktionen mit Eisenverbindungen an erster Stelle. Am meisten wird auch heute noch Ferrichlorid benutzt. Man hält die offizinelle Lösung vorrätig und verdünnt diese bei Bedarf mit etwa 10 Teilen destilliertem Wasser. Verdünnte Ferrichloridlösungen zersetzen sich bei längerer Aufbewahrung. Zu beachten ist jedoch, daß Ferrichlorid mit vielen aromatischen Verbindungen reagiert, welche eine oder mehrere Hydroxylgruppen besitzen. Viele gerbsaure Eisenverbindungen werden von verdünnten Säuren gelöst. Selbst die verdünnte Ferrichloridlösung löst die Niederschläge, besonders von eisengrünenden Gerbstoffen, leicht auf. Möller suchte diesem Nachteil abzuhelfen, indem er eine Lösung von wasserfreiem Ferrichlorid in wasserfreiem Äther als Reagens benutzte[3]). Mit dieser Lösung prüfte er größere Blattstücke. Die Lösung ist nur einmal zu benutzen. Eine gute Reaktion gibt Liquor ferri acetici, doch diffundiert die Lösung sehr langsam. Handelt es sich daher um den Nachweis in größeren Gewebestücken, so leistet die schneller eindringende, offizinelle Tinctura ferri acetici bessere Dienste. Wässerige Ferrosulfatlösung (1,0 g Ferrum sulfuricum alcohol. praec., 20,0 g

[1]) O. Baumgärtel, Die Farbstoffzellen von Ricinus communis L., Ber. deutsch. bot. Ges., 1917, XXXV, S. 603.

[2]) H. Molisch, Über einen neuen Fall eines Anthocyanophors in der Fruchtoberhaut von Gunnera chilensis, Protoplasma 1927/1928, III, S. 312.

[3]) H. Möller, Anatomische Untersuchungen über das Vorkommen der Gerbsäure, Ber. d. bot. Ges., 1888, VI, S. 66.

Wasser), die bereits die älteren Autoren (Trécul, Karsten) benutzten und die schon von Link[1]) empfohlen wurde, ist sehr außer Gebrauch gekommen, da sich die Lösung selbst bei Lichtschutz nicht gut hält; sie liefert aber brauchbare Reaktionen und zuweilen bessere als andere Eisenreagentien. Loew und Bokorny[2]) bedienten sich einer konzentrierten wässerigen Lösung von Ferrosulfat zum Gerbstoffnachweis in Algen. Die Algen verblieben 12—24 Stunden in der Ferrosulfatlösung. Schwaches Erwärmen (auf 60⁰) soll die Reaktion beschleunigen. Büttner[3]) hält die Eisenverbindungen für die besten mikrochemischen Reagentien auf Gerbstoffe und gebraucht von den verschiedenen Eisensalzen 0,02—0,2proz. Lösungen in ganz schwach saurem Zustande, u. a. auch Ferrum citricum ammoniatum (Ferrum citricum oxydatum wird mit Ammoniak bis zur schwach sauren Reaktion abgestumpft).

Die Eisenreagentien geben teils blaue bis blauschwarze, teils grünliche Reaktionen; es ist bekannt, daß man früher die Gerbstoffe in eisenbläuende und eisengrünende einteilte. Aus dem Eintreten einer blauen oder grünen Reaktion läßt sich in mikrochemischer Hinsicht kein Urteil fällen, da gleichzeitig anwesende Pflanzensäuren (Zitronensäure) die Färbung modifizieren können (Blau in Grün überführen).

Gerbstoffe können durch Formalin in fester Form ausgefällt und dann noch mit Eisensalz nachgewiesen werden[4]). Man bringt die grob zerkleinerten Objekte (Rinden in Streifen von 3—4 cm Länge und 1 cm Breite, Zweigstücke von 0,5 cm Dicke in 2—3 cm langen Stücken, stückenhalbiert) 24 Stunden in etwa 8proz. Formalin. Als Eisensalz wird gewöhnlich Eisenvitriol verwendet. Man kann dann außerdem noch die verholzten Teile durch Safranin färben.

Die Präparate lassen sich in Glyzerin oder Kanadabalsam aufbewahren.

Kaliumdichromat, zuerst von Sanio[5]) empfohlen, wird vielfach benutzt. Es ist jedoch ebenfalls kein spezifisches Reagens auf Gerbstoff, denn es gibt braune Niederschläge mit Brenzcatechin, Hydrochinon, Pyrogallol, heißen α-Naphthollösungen, Gallussäure, reagiert

[1]) Link, Grundlehren der Anatomie, 1807, S. 80.

[2]) O. Loew und Th. Bokorny, Über das Verhalten der Pflanzenzellen zu stark verdünnter alkalischer Silberlösung, Botan. Centralbl., 1889, XXXIX, S. 370.

[3]) R. Büttner, Über Gerbsäure-Reaktionen in der lebenden Pflanzenwelt, Dissertation Erlangen 1890.

[4]) A. Fietz, Formalin als Fixierungsmittel in der botanischen Mikrotechnik, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1922, XXXIX, S. 193 u. 1925, XLII, S. 257.

[5]) C. Sanio, Vgl. Unters. über die Zusammensetzung des Holzkörpers, Botan. Ztg., 1863, XXI, S. 17.

mit Alkaloiden u. a. Man legt die Präparate (vorteilhaft von lebenden Pflanzen) auf dem Objektträger direkt in wässerige Kaliumdichromatlösung (1 : 10). In gerbstoffhaltigen Zellen entsteht ein dichter grau- oder rotbrauner, flockiger oder körniger Niederschlag, der sich oft zusammenballt. Die Fällung ist unlöslich in Glyzerin, Wasser und Weingeist, und wird weder durch schweflige Säure noch durch Wasserstoffperoxyd verändert (Overton)[1]. Die rotbraune Färbung entsteht zuweilen erst nach einiger Zeit. Aus den Farben der Fällungen lassen sich annähernde Schlüsse auf die Menge des anwesenden Gerbstoffes ziehen. Ein flockig-körniger Niederschlag rührt von gelöstem Gerbstoff her; die Gerbstoff-Kugeln oder -Vakuolen pflegen sich homogen braun zu färben. Eine homogene, mehr oder weniger dunkelgelbbraune Färbung (und kein Niederschlag) entsteht auch, wenn Oxalsäure oder saure oxalsaure Salze zugegen sind[2]. Ferner können Apfel-, Wein-, Zitronensäure u. a. den Niederschlag verhindern. Möller hält den Niederschlag für ein Oxydationsprodukt und zwar für Purpurogallin (?). Wahrscheinlich gibt es mehrere Purpurogalline, da sich die Niederschläge gegen Alkalien und Säuren verschieden verhalten, teils in Alkalien und in Säuren leicht löslich, teils in konzentrierten Säuren unlöslich sind.

Viel angewandt wird die Mazeration. Man legt größere Pflanzenstücke auf mehrere Tage in eine konzentrierte Kaliumdichromatlösung ein, wäscht die Pflanzenteile in fließendem Wasser gut aus und fertigt aus ihnen erst die Schnitte an. Die Schnitte lassen sich zur Herstellung von Dauerpräparaten verwenden, da die Niederschläge sich in Glyzeringelatine halten. Zum Einlegen in Kanadabalsam müssen die Präparate zuvor durch Weingeist entwässert und mit Nelkenöl aufgehellt werden. Um ein schnelles Eindringen der Chromatlösung zu bewirken, empfahl af Klercker[3]) die Objekte (Algen in toto, von höheren Pflanzen die Schnitte) auf einige Augenblicke in eine kochende Kaliumdichromatlösung zu tauchen, während Möller (a. a. O.) das geringe Diffusionsvermögen durch Zusatz einiger Tropfen Essigsäure erhöht und Berthold[4]) das Material in eine konzentrierte Kaliumdichromatlösung

[1]) E. Overton, Beiträge zur Histologie und Physiologie der Characeen, Botan. Centralbl., 1890, XLIV, S. 5.

[2]) M. Küstenmacher, Beiträge zur Kenntnis der Gallenbildung mit Berücksichtigung des Gerbstoffes, Jahrb. f. wiss. Bot., 1894, XXVI, S. 82.

[3]) J. af Klercker, Studien über die Gerbstoffvakuolen, Dissertation Tübingen 1888. Abdruck aus Bihang till K. Svenska Vet.-Akad. Handlingar, Stockholm 1888, Afd. III, Nr. 8, Sep.

[4]) G. Berthold, Untersuchungen zur Physiologie der pflanzlichen Organe, 1. Teil, Leipzig 1898.

untertaucht, die ½—1 Stunde unter der Glocke der Wasserluftpumpe belassen wird. Die Stücke werden nach dem Auswaschen sofort untersucht oder in konzentriertem Glyzerin konserviert.

Chromsäure in verdünnten Lösungen (0,5—1,0proz.) wirkt ähnlich wie Kaliumdichromat, hat sich aber als Gerbstoffreagens nicht allgemein eingebürgert. Durch Kombination von Chromsäure mit Osmiumsäure (Flemmingsche Chromosmiumsäure, von J. af Klercker empfohlen) läßt sich mit der Fällung der Gerbstoffe gleichzeitig eine Fixierung des Plasmakörpers erzielen.

Das von Unverdorben und Franchimont 1871 zum mikrochemischen Harznachweis benutzte Kupferazetat (S. 351) führte Moll[1]) als Gerstoffreagens ein. Größere Pflanzenstücke werden 1—3 Wochen in einer konzentrierten wässerigen Lösung von kristallinischem Kupferazetat mazeriert. Die Pflanzenteile werden ausgewaschen. Die Präparate zeigen die Gerbstoffällungen als bräunliche Klumpen, die durch Zusatz von verdünnten Eisenreagentien (0,5 % wässerige Ferriazetatlösung) blaue oder grüne Färbung annehmen. af Klercker empfahl eine alkoholische Kupferazetatlösung (kristallinisches Kupferazetat in absolutem Alkohol gelöst; die filtrierte Lösung muß vor Licht geschützt aufbewahrt werden), wodurch zugleich das Plasma gehärtet wird. Die gleiche Wirkung erreicht man durch Aufkochen kleinerer Pflanzenstücke (1—2 cm große) in einer konzentrierten wässerigen Kupferazetatlösung. Die Nachbehandlung der Kupferfällungen mit Eisensalzen ist nach eigenen Beobachtungen unbedingt notwendig, da sonst Irrtümer durch mitgefällte Harze und Fette nicht ausgeschlossen sind.

Das Einlegen größerer Pflanzenteile in Lösungen von Kaliumdichromat oder von Kupferazetat wurde von Wagner[2]) in größerer Ausdehnung zum Nachweis des Gerbstoffes bei den Crassulaceen benutzt. Die von diesem Autor außerdem benutzte Mazeration mit Bleiazetat ist nicht zu empfehlen. Büsgen[3]) injizierte die Objekte mit Kaliumdichromat, ließ sie absterben und nahm sie nach sorgfältigem Auswaschen in Untersuchung.

Die reduzierenden Eigenschaften mancher Gerbsäuren werden bei der Osmiumsäurereaktion benutzt, die von Dufour[4]),

[1]) J. W. Moll, Eene nieuwe mikrochemische looizuurreactie, Maanblad voor Naturwetenschappen, 1884, Rec. trav. chim., 1885, III, S. 363.

[2]) Ed. Wagner, Über das Vorkommen und die Verteilung des Gerbstoffes bei den Crassulaceen, Dissert. Göttingen, 1887.

[3]) M. Büsgen, Beobachtungen über das Verhalten des Gerbstoffes in den Pflanzen, Jenaische Zeitschr. für Naturwiss., 1889, Sep.

[4]) J. Dufour, Notices microchimiques sur le tissu épidermique des végétaux, Bull. de la Soc. vaud. d. Sc. nat. 1886, XXII, S. 134.

Stadler[1]), Pick u. a. angewandt wurde. Osmiumsäure (1 proz.) wird den unter Deckglas liegenden Präparaten zugesetzt und ruft dunkle bis schwarze Färbungen und Fällungen hervor. Nun reagiert bekanntlich Osmiumsäure ebenfalls mit Harzen und Fetten. Im Mesophyll der Blätter sind überwiegend Gerbstoff und Fett zugleich enthalten. Man muß daher Vergleichspräparate zu Rate ziehen und aus einem Teil der Schnitte entweder Harze und Fette durch Äther oder aber den Gerbstoff entfernen, indem man die Schnitte erst im Reagenzglase mit Wasser behandelt (schüttelt) und dann unter Deckglas mit 50—70 proz. Weingeist auswäscht (in dem die meisten Fette unlöslich sind). Vorbehandelte und nichtvorbehandelte Schnitte werden nun unter einem Deckglase mit Osmiumsäure behandelt. Auf einfachere Weise läßt sich aber Gerbstoff von Fetten mit Hilfe von Eau de Javelle unterscheiden; in diesem Reagens zersetzen sich Gerbstoffe schnell, während Fette nicht angegriffen werden (Zimmermann). Durch Osmiumsäure hervorgerufene Blaufärbung deutet meist auf Gerbstoff. Die Blau-Färbung oder -Fällung tritt klarer hervor, wenn man die Präparate in einen Tropfen verdünnter Salzsäure einträgt und dann erst Osmiumsäure zusetzt (Dufour). Die mit Osmiumsäure gefärbten Gerbstoffe werden durch Wasserstoffperoxyd wieder entfärbt.

Gardiner[2]) führte Molybdänsäure als Gerbstoffreagens ein. Es wird eine konzentrierte Lösung von molybdänsaurem Ammon in konzentrierter Chlorammonlösung benutzt, welche in gerbstoffhaltigen Zellen gelbe Niederschläge hervorruft, mit Digallussäure (Tannin) aber einen roten Niederschlag gibt; der rote Niederschlag ist in Chlorammonium unlöslich, der gelbe löst sich darin. Möller (a. a. O.) hielt das molybdänsaure Ammon für das beste Reagens, zumal es in schwach alkalischer Lösung (durch Ammoniakzusatz) die Zellen schnell durchdringt. Braemer hingegen bezeichnet als Nachteile der Methode, daß die Niederschläge sich leicht in Wasser und verdünnten Säuren lösen und das Reagens selbst sehr wenig haltbar ist. Er empfiehlt daher Natriumwolframat mit Natriumazetat (1,0 g Natriumwolframat, 2,0 g Natriumazetat, 10 ccm Wasser)[3]). Das Reagens fällt in saurer oder in ammoniakalischer Lösung Gallussäure braun, Gallusgerbsäure

---

[1]) S. Stadler, Beiträge zur Kenntnis der Nectarien und Biologie der Blüten, Berlin 1888.

[2]) W. Gardiner, The determination of Tannin in vegetable cells, The Pharm. Journ. and Transact., 1884, S. 588.

[3]) L. Braemer, Un nouveau réactif histo-chim. des tannins, Bull. Soc. d'Hist. Nat. de Toulouse, 1889, Janv., Sep., sowie: Les tannoides, introduction critique a l'histoire phys. des tannins et des principes immédiats végétaux, qui leur sont chimiquement alliés, Toulouse 1891.

gelb. Anwesenheit von Weinsäure oder Zitronensäure verhindert das Eintreten der Reaktion. Sonst ist die Reaktion recht empfindlich und zeigt noch 0,00001 g Gallusgerbsäure an.

Ferner sind Koffein und Antipyrin wiederholt benutzt worden. Hierbei wird die Lebenstätigkeit der Zellen nicht geschädigt. Von Overton[1]) wurden 0,25—0,50proz. Koffeinlösungen oder 1proz. Antipyrinlösungen bei Zellen mit rotem Zellsaft und bei Kryptogamen benutzt und von van Wisselingh[2]) 1proz. Lösungen von Antipyrin und 0.1proz. von Koffein bei Spirogyren. Die Algen können 10 Minuten ohne Schaden zu nehmen in den Reagentien verweilen. Die Einwirkung von Koffein wurde zuerst von Loew und Bokorny studiert (vgl. auch Lebendfällung).

Um die Lokalisation des Gerbstoffs nachzuweisen, bringt van Wisselingh[3]) zuerst mit 10proz. Kaliumnitratlösung abnormale Plasmolyse hervor und läßt dann etwa eine 10proz. Kaliumnitratlösung zufließen, die 1 % Antipyrin enthält.

af Klercker hat Alkalikarbonate (Ammonium-, Kalium-, Natriumkarbonat, Chlorammonium, auch Ammoniak) als Gerbstoffreagentien benutzt. Von höheren Pflanzen werden die Präparate frischen Materials auf dem Objektträger in eine 1—5proz. wässerige Lösung eingelegt. Nach kurzer Zeit entstehen kleinkörnige Fällungen, die sich allmählich zusammenballen und eventuell anwesende Farbstoffe (Anthocyane) mitfällen. Niedere Pflanzen (Algen) können in sehr verdünnten Lösungen (0,02 %) kultiviert werden. Sie zeigen dann die Gerbstofffällungen besonders deutlich bei Vergleichspräparaten. Die durch Alkalikarbonate bewirkten Fällungen lösen sich im Überschuß der Fällungsmittel und werden durch Kaliumdichromat homogen braun gefärbt. An lebendem Material können die Reaktionen zur Kontrolle dienen, bei Herbarmaterial und bei Drogen wird man praktischerweise ganz von ihnen absehen, da sie einmal keine Vorteile gegenüber den früher genannten Reagentien bieten und dann einerseits die oft anwesenden sauren Phosphate u. dgl. fällen, andererseits mit Gallussäure nicht reagieren.

[1]) E. Overton, Beobachtungen und Versuche über das Auftreten von rotem Zellsaft bei Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1899, XXXIII, S. 171.

[2]) C. van Wisselingh, Der Nachweis des Gerbstoffes in der lebenden Pflanze und seine physiologische Bedeutung, Verslag Verg. Kon. Ak. Wet. Amsterdam, 9 Maart 1910.

[3]) C. van Wisselingh, Über den Nachweis des Gerbstoffes in der Pflanze und über seine physiologische Bedeutung. Beihefte z. bot. Centralbl., 1915, XXXII, Abt. I, S. 155.

Gicklhorn[1]) verwendet zum Nachweis von Gerbstoff Rhodamin, das durch Spuren von Tannin nach Blau umschlägt.

Durch Behandlung von Epidermen mit Farbstoffen (Neutralrot, Methylenblau, Bismarckbraun) erhielt Linsbauer[2]) kugelige Gebilde, die offenbar mit denjenigen identisch sind, die Klercker als Gerbstoffblasen und Gerbstoffkugeln beschrieben hat.

Durch Anilinfarbstoffe können Gerbsäureblasen gefärbt werden, Gerbstoffe wirken auch speichernd. Die Gerbstoffverbindungen der Farbstoffe werden entweder ausgeschieden (Methylenblau, Methylviolett) oder bleiben mehr oder weniger gelöst (Fuchsin, Methylorange, Tropäolin 000).

Ein sehr brauchbaresReagens, das die Verteilung der Gerbstoffe innerhalb der lebenden Zellen zu beobachten gestattet, ist das von Pfeffer[3]) zur Lebendfärbung benutzte Methylenblau (eine filtrierte Lösung von 1,0 Methylenblau in 500 000,0 Regenwasser, s. Lebendfärbung). Die Reaktion ist nicht bei Organen ausführbar, die durch eine Kutikula, Wachsschichten, Korkmembranen u. dgl. geschützt sind. Versuchsobjekte sind Algen (Zygnema), zarte Wurzeln und Wurzelhaare (Stratiotes, Wurzelhaube). Den zu untersuchenden Objekten werden in Bechergläsern während mehrerer Stunden große Quantitäten der Farbstofflösung (1 Liter) zur Speicherung zur Verfügung gestellt. Bewegen der Lösung beschleunigt die Farbstoffaufnahme. Die Lebenstätigkeit der Zellen wird hierbei nicht gestört. Gerbstoffkugeln werden homogen blau, mit Gerbstoff erfüllte größere Vakuolen zeigen zunächst einen schwach blau gefärbten Vakuolensaft. Die Färbung nimmt allmählich an Intensität zu, wird stärker als die der zugeführten Lösung und schließlich entsteht ein blauer Niederschlag von gerbsaurem Methylenblau (af Klercker). Ob es sich in allen Fällen um Gerbstoffe handelt, erscheint fraglich. Nach Waage[4]) speichert Phloroglucin ebenfalls Methylenblau. Auch die phloroglucidischen Gerbstoffe der Rinden unserer Bäume und Sträucher speichern (an eingestellten Zweigen beobachtet) Methylenblau. Die Methylenblau-Färbung der Gerbstoffvakuolen verblaßt in Glyzeringelatine nach wenigen Wochen. Die Färbung läßt sich nach Zimmermann[5]) in Dauerpräparaten in fol-

---

[1]) Nach R. Keller, Protoplasma, 1926/27.

[2]) K. Linsbauer, Weitere Beobachtungen an Spaltöffnungen, Planta, 1927, III, S. 527.

[3]) W. Pfeffer, Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen, Untersuchungen aus dem bot. Institut zu Tübingen, 1886—1888, II, S. 179.

[4]) Th. Waage, Über das Vorkommen und die Rolle des Phloroglucins in der Pflanze, Ber. deutsch. bot. Ges., 1890, VIII, S. 250.

[5]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik, Tübingen 1892, S. 228.

gender Weise erhalten: Die gefärbten Objekte kommen auf 2—24 Stunden in eine konzentrierte wässerige Pikrinsäurelösung, werden wiederholt in reinem Wasser umgeschwenkt, dann zunächst in 15proz. Weingeist, allmählich in konzentrierteren Weingeist gebracht, darauf in ein Gemisch von 3 Teilen Xylol und 1 Teil Alkohol, dann in Xylol übertragen und schließlich in Kanadabalsam eingeschlossen. Bei der Übertragung in Kanadabalsam sind Nelkenöl, Phenol oder Anilin nicht zu verwenden, da sie die Färbung sofort auswaschen. Klercker[1]) fixiert einige Stunden mit Chromessigsäure (Flemming) oder 1—2 Tage mit einem Gemisch von gleichen Teilen Pikrinschwefelsäure und konzentrierter Kupferazetatlösung, wäscht mit Wasser aus, schneidet in Paraffineinbettung und schließt in Kanadabalsam ein; im ersteren Falle (bei Fixierung mit Chromessigsäure) sind die Gerbstoffvakuolen braunrot, im letzteren Falle grünlich.

Gertz[2]) benutzt zum Nachweis der Gerbstoffe Anthocyane. Er fällt die Gerbstoffe erst nach Sanio mit Kaliumdichromat und läßt dann eine wässerige Lösung des Anthocyans mit oder ohne Zusatz von Schwefelsäure 12—24 Stunden einwirken. Zur Beseitigung der leicht eintretenden Überfärbung werden die Schnitte mit schwach angesäuertem Wasser ausgewaschen. Durch Übertragen in Bleiazetatlösung konnte er die Färbung mit blauer Farbe fixieren.

Zur Darstellung der Anthocyanlösungen benutzte Gertz folgende Methode: Die Pflanzenteile werden mit schwach (mit Schwefelsäure) angesäuertem Wasser ausgekocht oder der Saft wird, nachdem man das frische Pflanzenmaterial in einer Reibschale zerquetschte, ausgepreßt und durch Filtrieren, sowie nach den von Berzelius und Marquart empfohlenen Methoden geklärt. Fällung mit Bleiazetat, Zerlegung des Bleiniederschlags durch Schwefelwasserstoff. Die Lösungen sind zu sterilisieren. Als Farbstoffe verwendete Gertz in diesem Falle außer den „gewöhnlichen Anthocyanarten (von Weigerts Gruppe Vitis-Rot)“ auch Extrakte aus Blättern von Achyranthes Verschaffeltii und Aerua sanguinolenta und Phytolacca-Saft.

Gerbstoff gibt mit A. P. Sudan (s. S. 247) einen bräunlichroten amorphen körnigen Niederschlag (Czapek).

Eine Verwechslung kutinisierter Membranen mit gerbstoffhaltigen ist möglich.

[1]) J. af Klercker, Über Dauerpräparate gerbstoffhaltiger Objekte, Verh. biolog. Ver. Stockholm, 1891, IV, Nr. 3.

[2]) O. Gertz, Über die Verwendung von Anthocyanfarbstoffen für mikrochemische Zwecke, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1916, XXXIII, S. 7.

Bei Rosaceen, die eisengrünenden Gerbstoff enthalten, z. B. der Rinde und den Blättern von Prunus laurocerasus tritt nach Peche[1]) folgende Reaktion ein: Erhitzt man die Schnitte auf dem Objektträger möglichst rasch über starker Flamme mit einer Mischung gleicher Teile 20proz. Kalilauge und Formol, so tritt eine blaugrüne, streng lokalisierte Färbung auf, die auf Zusatz von Salz- oder Essigsäure in Zinnober- oder Karminrot umschlägt. Peche versuchte weiter zu zeigen, daß diese Farbstoffe nur aus eisengrünenden Gerbstoffen entstehen, in ihrer Lokalisation mit derjenigen der natürlichen Anthocyane übereinstimmen, und daß letztere bei den Rosaceen ebenfalls aus jener Gruppe von Tannoiden gebildet werden. So fand er beispielsweise in Querschnitten durch Pirusblätter die Lokalisation des gebildeten Farbstoffs in Übereinstimmung mit der des natürlichen Anthocyans in herbstroten Blättern, nämlich in einzelnen Zellen der oberen und unteren Epidermis, einzelnen Palisadenzellen und einzelnen Schwammparenchymzellen.

Nachweis von Gerbstoff nach Sperlich[2]):

Die Schnitte werden zur Entfernung von Luft kräftig mit Wasser geschüttelt (oder mit der Luftpumpe behandelt). Dann gibt man in ein kleines, ungefähr 5 ccm fassendes Glasröhrchen einen Jodsplitter von 1—2 qmm Größe und gießt 1 ccm Wasser darauf, ohne zu schütteln. Die Schnitte werden aus dem Wasser nach Abwaschen mit Wasser in die noch völlig farblose Jodlösung gebracht und völlig darin untergetaucht. Nach frühestens 4—8, in der Regel nach 12—24 Stunden werden die Schnitte in Weingeist gebracht, der den Schnitten das von verschiedenen Elementen adsorbierte Jod je nach der Länge der Einwirkung mehr oder minder entzieht. Aus den Gerbstoffen sind durch diese Behandlung — nach Sperlich wahrscheinlich infolge von Oxydation — gefärbte unangreifbare Körper geworden, die im Saftraum der Zellen liegen. Die Schnitte vertragen i. A. jedes weitere Färbe- und Einschlußverfahren.

Hatte man die Behandlung der Schnitte mit Weingeist soweit ausgedehnt, daß die Stärkekörner entfärbt wurden, so genügt es, einige Tropfen Salzsäure zu dem Wasser oder dem Weingeist, in dem die Schnitte liegen, zuzusetzen, um die Blau-Färbung wieder herzustellen.

---

[1]) K. Peche, Über eine neue Gerbstoffreaktion und ihre Beziehung zu den Anthocyanen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1913, XXXI, S. 462. Vgl. dazu M. Tswett, Zur Kenntnis des vegetabilischen Chamäleons, ebenda 1914, XXXII, S. 61.

[2]) A. Sperlich, Jod, ein brauchbares mikrochemisches Reagens für Gerbstoff, insbesondere zur Darstellung des Zusammenhanges der Verteilung von Gerbstoff und Stärke in pflanzlichen Geweben, Ber. deutsch. bot. Ges., 1917, XXXV, S. 69 und Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien math. naturw. Kl., Abt. 1, 1917, CXXVI, S. 103.

Nach den Beobachtungen Tunmanns[1]) ist auch Goldchlorid ein allgemeines Reagens auf Gerbstoffe. Zuerst entsteht gewöhnlich ein chromgelber bis rotbrauner Niederschlag, dann bilden sich tiefschwarze Tröpfchen. Die Niederschläge geben noch die charakteristischen Reaktionen mit Ferrichlorid.

Weitere Reagentien sind Titanlösung, Zinnsalz und Schwefelammonium. Makroskopisch geben diese Reagentien zweifelsohne brauchbare Resultate, für Schnitte sind sie nicht oder doch nur wenig geeignet[2]). Auch Kalilauge ruft in Gerbstoffzellen Färbungen hervor (gelb, rotbraun). Urannitrat, Thalliumkarbonat, Palladiumchlorür u. a. wurden von Cavazza[3]) herangezogen.

Gerbstoffführende Vakuolen in der Epithelialschicht des Embryosackes der Cruciferen färben sich mit Millons Reagens rot und wurden deshalb von Vandendries fälschlicherweise als eiweißführend beschrieben[4]).

Möglicherweise wird in speziellen Fällen eisenhaltige Schwefelsäure (das Digitalinreagens Kilianis)[5]) als Hilfsreagens brauchbar sein, mit dem Brissemoret[6]) makrochemisch bestimmte Farbenreaktionen erhalten hat. Das Reagens gab nachstehende Färbung: I. Gallussäuretannoide: Pyrogallol rosagrünlich, Ellagsäure, Psidi-, Granato-, Nucigerbsäure grüngelb, Nuphargerbs., Hamamelistannin rot, Kinogerbs. rosa, Geraniumgerbs., Tannin der chinesischen Galläpfel gelb. II. Kaffeesäuretannoide: Brenzcatechin violett-blaugrün, Protocatechugerbs. keine Färbung, Kaffeesäure (Chlorogensäure?) scharlachfarben. III. Phloroglucintannoide: Phloroglucin gelb, Quebracho-, Eichengerbs. dunkelrot, Filix-, Sorbusgerbs. scharlachrot, Äsculingerbs. rotviolett, Tormentill-, Ratanhia-, Arecagerbs. und das Tannoid von Rhus triphyllum bordeauxrot, Cachou-, Guarana-, Credelagerbs., Catechin, Colatannin purpurn.

Mit Gerbstoff durchtränkte Eiweißkörper werden von Osmiumsäure gebräunt (Overton). Um Gerbstoff in den Aleuronkörnern nachzuweisen, entfettet man die Präparate zuvor mit Äther (s. Aleuron). Die Zystolithen der Urtica-

[1]) O. Tunmann, Über den Nachweis und die Lokalisation des Andromedotoxins in Ericaceen, Apoth.-Ztg., 1911, XXVI, S. 555.

[2]) W. Eitner und Meerkatz, Untersch. des Kastanienextraktes vom Eichenholzextrakt, Just Jahrber., 1886, II, S. 287. — W. Eitner, Über einige Reaktionen der Gerbstoffe, Arch. f. Chem. u. Mikr., 1911, IV, S. 109.

[3]) L. E. Cavazza, Studi microchimici e fisiologici sui tannini, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1909, XXVI, S. 59.

[4]) J. Lachertowa Wsprawie t. zw. „enclaves protéiques" Vandendries'a. Acta Soc. Bot. Polon., 1927, V, S. 60. Ref. in Bot. Centralbl., 1929, CLVI, S. 273.

[5]) Das Reagens besteht aus 100 ccm reiner Schwefelsäure + 1 ccm einer 5 proz. wässerigen Lösung von Ferrum sulfuricum purissimum; Kiliani, Über den Nachweis der Digitalisglykoside und ihrer Spaltungsprodukte, Arch. d. Pharm., 1896, CCXXXIV, S. 273.

[6]) A. Brissemoret, Über eine Farbenreaktion der Tannoide, Bull. Soc. chim. France, 1907, 4 ser. I, S. 474.

ceen und Acanthaceen geben Gerbstoffreaktion (Ferrichlorid dunkelgrün, braun, rostrot, Molisch). — Eigenartige Gerbstoffkugeln und „Ligninkörper" hat Hartwich in der Nahrungsschicht der Infektoriagallen aufgefunden und beschrieben und ist auf diese Bildungen nochmals 1905 eingegangen[1]). — Gerbstoffähnliche Tröpfchen hat Wallin[2]) in den Gefäßbündelscheiden der Bromeliaceenblätter beschrieben. Sie lösen sich in kochendem Wasser, Ammoniak, Essigsäure, Eau de Javelle, 40proz. Weingeist, werden durch Osmiumsäure schwarz, durch Jodjodkalium rot, 4 % Ferriazetat tiefschwarz, durch Kupferazetat nach einigen Tagen kupferfarbig, durch Ammoniumdichromat homogen braun (im Gegensatz zu den Gerbstoffvakuolen, die hierbei körnig braun werden). Die schwach gelblichen Tropfen sollen einen oxyaromatischen Körper enthalten.

Kristallisierte Stoffe, die von ihren Entdeckern zu den Tanniden gerechnet werden, kommen in Dionaea muscipula (H. Molisch)[3]) und mehreren Geranium-Arten (C. Wimmer)[4]) vor.

Aus frischen Schnitten durch die Blattspreite des geflügelten Blattstiels oder die Wurzel von Dionaea muscipula erhält man durch verschiedene Mittel (Glyzerin, konzentrierte Zuckerlösung, Erhitzen in Wasser, Einwirkung von Chloroformdampf, Säuren) allmählich Kristalle, die mit Eisenvitriol langsam dunkel- oder schwarzblau, auch mit Goldchlorid schwarzblau und mit Überosmiumsäure schwarz werden. Hält man einen Schnitt in eine Ammoniak-Atmosphäre oder bringt ihn in 1proz. Koffein- oder Antipyrinlösung, so entstehen Fällungen.

In Geranium pratense L. und einigen anderen Geraniaceen finden sich zitronengelbe Kristalle verschiedener Art nur in den unterirdischen Organen und zwar am reichlichsten in den Parenchymzellen der primären Rinde und des Markes, seltener im Interfaszikulargewebe. Derselbe Körper kommt in den lebenden Zellen auch gelöst vor. Er löst sich in wässerigen Ätzalkalien mit gelber Farbe. Mit konzentrierter Schwefelsäure verwandelt er sich allmählich in igelförmige Gebilde; mit Titan-Schwefelsäure (Denigès) gibt er eine rasch vorübergehende tiefviolette Farbe.

[1]) C. Hartwich, Ber. deutsch. bot. Ges., 1885, III, S. 146 u. Arch. d. Pharm., 1905, CCXLIII, S. 584.

[2]) G. S. Wallin, Über gerbstoffähnliche Tröpfchen im Zellsafte der Bromeliaceen-Blätter, Bot. Centralbl., 1898, LXXV, S. 323.

[3]) H. Molisch, Über einen leicht kristallisierenden Gerbstoff in Dionaea muscipula, Ber. deutsch. bot. Ges., 1915, XXXIII, S. 447.

[4]) Ch. Wimmer, Ein neuer kristallisierter Inhaltsstoff in den unterirdischen Organen von Geranium pratense L. und seine Verbreitung innerhalb der Familie der Geraniaceae, Ber. deutsch. bot. Ges., 1917, XXXV, S. 591.

Catechine, Phloroglucingerbstoffe und Inklusen

Eine große Anzahl von Gerbstoffen ist dadurch ausgezeichnet, sie mit Vanillin-Salzsäure oder Dimethylaminobenzaldehyd-Schwefelsäure Rotfärbung gaben. Da diese Reaktionen dem Phloroglucin zukommen, in den genauer untersuchten Stoffen dieser Gruppe ein Phloroglucinkern festgestellt wurde, so kann man die ganze Gruppe als Phloroglucingerbstoffe oder Phloroglykotannoide bezeichnen. Zwischen den einfacheren Stoffen dieser Gruppe, den Catechinen und den komplizierteren amorphen Gerbstoffen und Gerbstoffarten bestehen Zusammenhänge. In einer Anzahl von Fällen sind diese Stoffe als geformte Körper in Zellen abgeschieden (die sog. Inklusen).

Besonders reichlich sind die Gerbstoffe dieser Gruppe in der Rinde (Phloem- und Rindenparenchym) zugegen, dann im Mark, weniger im Holz, ferner in Laubblättern, Blüten, Früchten und Trichomen. Beim Absterben der Zellen zersetzen sie sich und bilden zum Teil wie viele andere Gerbstoffe Phlobaphene; das ist bei der Borke und bei den Blättern der Fall. Die eben abfallenden Laubblätter geben noch die Vanillinsalzsäurereaktion (s. unten), nicht aber das einige Zeit am Boden gelegene Laub und meist nicht die Borke. Lindt wies darauf hin, daß jene Blätter, die im Herbst Rotfärbung annehmen, die Reaktion in besonders starker Weise geben. Es wird hier jedenfalls schon eine Spaltung der Phloroglykotannoide derart eingetreten sein, daß der abgespaltene Nährstoff mit anderen Baustoffen in den Stamm abgewandert ist und nur die Phloroglucinderivate im Laube verbleiben. Waage meinte, daß Phloroglucin sich aus Stärke und Zucker aufbaue und sich in großem Maße in aktiver Weise am Stoffwechselprozeß beteiligte. Er fand Neubildung von Phloroglucin beim Keimen der Samen und in Blättern, die auf Zuckerlösung schwammen. Neubildung eines Körpers beweist indessen noch nicht, daß der neugebildete Körper auch ein Baustoff ist; mit gleichem Recht kann er ein Abfallprodukt sein (Tunmann). Phloroglykotannoide finden sich zuweilen in großer Menge in den sezernierenden Zellen der Sekretbehälter. Über die Verbreitung von Phloroglykotannoiden bei den Pirola-Arten s. Fürth (l. c. S. 409) S. 581. Phloroglucinderivate finden sich in vielen Sekreten, es sei nur an die taeniciden Drogen (Rhiz. Filicis, Kamala, Flor. Koso) erinnert. Bei der Gummibildung ist ebenfalls Anhäufung von Phloroglykotannoiden beobachtet (beim Kirschgummi[1]) und in den Tarihülsen[2])).

Weselsky[3]) wies Phloroglucin mit Kaliumnitrit und Toluidinnitrat (oder Anilinnitrat) nach, wobei eine rote Diazoverbindung entsteht. Bei 0,0005 g Phlorogluzin entsteht Gelbfärbung, bei 0,003 g

[1]) K. Mikosch, Unters. über die Entstehung des Kirschgummi, Sitzgsb. Wien. Ak., 1906, CXV, S. 926.

[2]) T. F. Hanausek, Über die Gummizellen der Tarihülsen, Ber. d. bot. Ges., 1902, XX, S. 82.

[3]) P. Weselsky, Ber. d. chem. Ges., 1876, IX, S. 216 und 1879, XII, S. 226.

nach 20 Minuten ein zinnoberroter Niederschlag. Eine ähnliche Reaktion gibt außerdem noch Catechin, Maclurin und ein Hopfenauszug. Die Methode Weselskys wurde von von Weinzierl[1]) mikrochemisch zum Nachweis des Phloroglucins in den Pflanzen benutzt. Lindt[2]) führte zum Nachweis die seitdem so vielfach benutzte Vanillinsalzsäure (0,005 g Vanillin, besser 0,05 g [Griebel], 0,5 g Alkohol, 0,5 g Wasser, 3,0 g konzentrierte Salzsäure) ein, da bekanntlich viele Phenole, in Salzsäure oder in Schwefelsäure gelöst, mit Aldehyden Farbreaktionen geben. Phenol, Brenzkatechin, Resorcin, Hydrochinon, Digallussäure, Salicin, Cumarin, Aesculetin, Aesculin, Phlorhizin, Chinolin, Eiweiß sollten keine Reaktionen mit Vanillinsalzsäure geben, wohl aber Orcin. Vanillinsalzsäure gibt nun mit Phloroglucin eine hellrote, später violettrote, mit Orcin hingegen eine hellblaue Farbenreaktion. Noch 0,000001 g. Phlorogluzin (trockene Substanz) ist mit Vanillinsalzsäure nachweisbar.

Die Lindtsche Angabe, daß Phlorhizin keine Reaktion mit Vanillinsalzsäure geben soll, trifft nicht zu und ließ seine anderen Befunde in dieser Hinsicht zweifelhaft erscheinen. In der Tat zeigte Waage[3]), daß mit Vanillinsalzsäure außer Phloroglucin und Orcin noch Resorcin und Pyrogallol reagieren, sowie nach Winckel[4]) noch Thymol, Kreosot, Cresorcin, Pyrogalloldimethyläther, Oxyhydrochinon, ferner Phlorhizin, Maclurin, Luteolin, Morin und Catechin. Moeller[5]) deutete die Reaktion auf Tannoide. Da zudem gewisse Eiweißstoffe ähnliche Farbenreaktionen geben, so ist bei der Deutung der Vanillinsalzsäurereaktion Vorsicht geboten. Immerhin ist das Reagens zum Nachweis von Phloroglucinderivaten brauchbar, zumal nach Hartwich und Winckel[6]) von den Tannoiden (in der Gruppierung von Kunz-Krause), die nicht glykosidischen Tannoide und die sich von der Dioxyzimtsäure ableitenden Tannoide (Coffea, Mate, Strychnos, Fabiana imbricata) keine Reaktion geben. Die Reaktion mit Vanillinsalzsäure tritt ein bei sämtlichen Phloroglykotannoiden.

[1]) von Weinzierl, Öster. bot. Zeitschr., 1876, XXVI, S. 285.

[2]) O. Lindt, Über den Nachweis von Phloroglucin, Zeitschr. f. wiss. 1885, II, S. 495.

[3]) Th. Waage, Über das Vorkommen und die Rolle des Phloroglucins in der Pflanze, Ber. deutsch. bot. Ges., 1890, VIII, S. 250.

[4]) M. Winckel, Über das angebliche Vorkommen des Phloroglucins in den Pflanzen, Berner Dissertation, 1903.

[5]) N. Moeller, Über das Vorkommen von Phloroglucin in den Pflanzen, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1897, VII, S. 344.

[6]) C. Hartwich u. M. Winckel, Arch. d. Pharm., 1904, CCXLII, S. 462.

Die Einwirkung der Vanillinschwefelsäure (s. S. 372) auf eine große Anzahl Substanzen haben Arnould und Goris[1]) studiert. Sie kommen zu dem Ergebnis, daß die durch das Reagens hervorgerufenen roten Färbungen Phenole anzeigen, die gelben Färbungen stickstoffhaltige Körper (meist der NH_2-Gruppe), und die violetten Färbungen zusammengesetzte Terpene.

Während nach Waage in den Pflanzen freies Phloroglucin auftreten sollte (das gebundene in Form von Phloro-gluciden und -glykosiden soll mit Vanillinsalzsäure nicht reagieren), Moeller andererseits das Vorkommen von Phloroglucin ganz in Abrede stellte und die Reaktion auf die Anwesenheit von Tannoiden gründete, beziehen wir jetzt die Reaktion mit Hartwich und Winckel auf Phloroglykotannoide. Die mit Vanillinsalzsäure rot (zinnober-, purpur-, karmin-, violettfarbig) werdenden Zellen geben somit gleichzeitig die Reaktionen auf Gerbstoffe und speichern in lebendem Zustande, wie schon Waage fand, Methylenblau. — In einigen Fällen tritt nur die Vanillinsalzsäurereaktion ein, während Gerbstoffreaktionen entweder negativ oder sehr unklar zu erzielen sind. Bei vielen Obstfrüchten und dem Rhizom von Acorus calamus erfolgt die Reaktion mit Ferrichlorid erst an getrocknetem Material, bei Acorus (Rhizom) aber auch bei frischem Material des Herbstes.

In Kürze sei darauf hingewiesen, daß der Vanillinsalzsäurereaktion eine diagnostische Bedeutung zukommt. Beimengungen von Ceratonia und Phoenix im Kaffee lassen sich sofort an der Rötung ihrer Inklusen (s. w. unten) erkennen. — Nur das Sekret des Rhizoms von Alpinia galanga wird gerötet, nicht das von Curcuma longa, C. zedoaria, Zingiber officinale (?). — Von den Harzen geben die Reaktion Resina Draconis und Kino, welche bei der Kalischmelze Phloroglucin liefern, sowie die alkoholische Lösung der offizinellen Heerabolmyrrha, nicht die der Bisabolmyrrha (Hartwich und Winckel). — Das Reagens dient zur Unterscheidung der Bärentraubenblätter und ihrer Verwechselungen, sowie der Frangularinde von der Rinde von Prunus padus (Tunmann). — Nach Arnould und Goris färbt sich die Rinde sämtlicher Coniferen und die von Thuja und vieler Rosaceen rot, einiger Ranunculaceen rosa; doch geben sehr viele Pflanzen und Harze keine Färbung.

Ein weiteres Reagens auf diese Gruppe ist von Joachimowitz[2]) angegeben worden:

[1]) L. Arnould et A. Goris, Action du réactif sulfovanillique de Ronceray sur quelques composés chimiques et quelques végétaux, Bull. d. scienc. pharmacolog., 1909, XVI, S. 191.

[2]) M. Joachimowitz, Ein neues Reagens auf Phloroglucin, Catechin und ihre Derivate, sowie über die Verbreitung derselben im Pflanzenreiche, Biochem. Zeitschr., 1917, LXXXII, S. 324.

Eine Lösung von 0,5 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in '8,5 g Schwefelsäure wird mit 8,5 g Wasser versetzt. Das Reagens gibt mit Catechin, Phloroglucin und den meisten seiner Derivate sofort eine Rotfärbung (oder in Lösungen einen roten Niederschlag). Ausnahmen: Hesperidin und Hesperetin, Phlorizin, Filicin und Maclurin. Das Verhalten ist im wesentlichen analog dem der Vanillin-Salzsäure. Zur Anwendung bringt man das Präparat in einen Tropfen des Reagens. Eine Kontrolle mit einem Gemisch gleicher Teile Schwefelsäure und Wasser schützt (besonders bei Gegenwart von Anthocyanen) vor Irrtum.

Da auch Catechin die Reaktion gibt, so können die Inklusen auch dessen Derivate enthalten.

Aus dem negativen Ausfall der Reaktion darf nicht auf das Fehlen von Phloroglucin oder Catechin geschlossen werden, da getrocknete Catechingerbsäure im Gegensatz zur frisch gefällten und älteren Inklusen von Gladiolus im Gegensatz zu jüngeren die Reaktion nicht geben.

Die Reaktion tritt im Pflanzenreich erst mit den Pteridophyten auf.

Zu den Gerbstoffen dieser Gruppe zählen die vielfach untersuchten Einschlüsse vieler Früchte (Fruchtfleisch, Testa), die Tichomirow[1]) **Inklusen** genannt hat, die dann später auch in Blättern beobachtet wurden, und deren Substanz zuerst von Hartwich und Winckel (a. a. O.) als Phloroglykotannoid aufgefaßt wurde. Zuerst wurden Inklusen bei Ceratonia siliqua L. und Rhamnus cathartica L. von Flückiger[2]) aufgefunden (bei Ceratonia entwicklungsgeschichtlich von Hällström[3]) untersucht), dann fand Braun[4]) dergleichen bei Phoenix dactylifera, wo sie Hanausek[5]) entwicklungsgeschichtlich verfolgte. Sie kommen ferner vor in den Früchten von Rhamnus- und Sorbus-Arten, von Mespilus germanica L. (Hanausek)[6]), von Tamarindus (Vogl)[7]) und in der Testa der Pimentfrüchte (Schimper)[8]).

[1]) W. Tichomirow, Sur les inclusions intracellulaires du parenchyme charnu de la Datte, Bull. d. Congr. intern. d. Bot. de St. Pétersbg., 1885, S. 79.

[2]) F. A. Flückiger, Pharmakognosie, 1867, I. Aufl., S. 585.

[3]) K. H. Hällström, Zur Entwicklungsgesch. d. Fruchtwand von Ceratonia Siliqua L. u. Tamarindus indica L., Ber. deutsch. pharm. Ges., 1910, XX, S. 446.

[4]) Braun, Über das Vorkommen von Sphärokristallen aus Traubenzucker in den verschiedenen Drogen, Zeitschr. d. allg. öster. Apoth.-Ver., 1878, XVI, S. 341.

[5]) T. F. Hanausek, Zur Kenntnis der Anat. der Dattel und ihrer Inklusen, Pharm. Post, 1910, XLIII, S. 1041.

[6]) T. F. Hanausek in Wiesners Rohstoffe, 2. Aufl., II. Bd., S. 853.

[7]) A. Vogl, Kommentar z. öster. Pharmak., VI, 1880.

[8]) A. F. W. Schimper, Anleit. z. mikrosk. Unters., 1888, S. 87.

Tichomirow[1]) fand sie in Diospyros- und Anona-Arten, in Zizyphus vulgaris Lam., Elaeagnus angustifolius L., ferner in den Blättern von Rhamnus cathartica. Stscherbatscheff[2]) entdeckte dergleichen in der Fruchtwand von Glycyrrhiza. Ähnliche Körper scheinen in Sempervivum- und Echeveria-Arten vorzukommen.

Tunmann[3]) untersuchte die Inklusen in den Früchten von Rhamnus cathartica und Glycyrhiza glabra, Hanausek[4]) fand sie im Blatt von Pistacia Lentiscus. Senft[5]), der ihr Vorkommen in den vegetativen Teilen von Glycyrrhiza untersuchte, kommt zur Ansicht, daß sie das mechanische Gewebe unterstützen oder ersetzen und außerdem die Transpiration herabsetzen. Möglicherweise bieten sie auch beim Vorkommen in einer subepidermalen Schicht von Glycyrrhiza einen Schutz gegen Pilze[6]).

In Blättern sind Inklusen häufig besonders bei solchen, die sich von Haus aus durch hohen Gerbstoffgehalt auszeichnen, sie werden aber oft erst gegen das Ende der Vegetationsperiode und nach dem Trocknen des Blattes deutlich oder sogar auffallend (Netolitzky). Die braunen Massen in den „Gerbstoffschläuchen" der Crassulaceen verhalten sich gegen Kalilauge anders als typische Inklusen. Diese finden sich bei Salix glabra, Corylus- und Betula-Arten, Quercus-Arten, Ulmus, besonders Ulmus campestris, Polygonum bistorta, viviparum, hydropiper, Illecebrum, verticillatum (?), Ceratophyllum demersum (?), Sedum album, maximum etc. (?), Sempervivum (?), Platanus-Arten, Sorbus, Cotoneaster, Mespilus, Ceratonia, Trigonella, Doronicum, Robinia, Lotus, Onobrychis, Coronilla, Rhamnus, Ceanothus, Helianthemum obscurum Pers., Chamaenerium (?), Lysimachia (?), Glaux, Chimaphila, Pirola chlorantha, Gaultheria, Arctostaphylos glauca, Vaccinium oxycoccos, Armeria alpina, Statice cancellata, Apocynum venatum.

[1]) W. Tichomirow, Sur les inclusions intracellulaires du parenchyme charnu de certains fruits: Datte, Kaki, Jujube, Anone et Chalef, Compt. rend., 1904, CXXXIV, S. 305, ferner Bull. d. l. soc. d. Naturalistes d. Moscou, 1905, und: Die johannisbrotartigen Interzellulareinschließungen im Fruchtparenchym mancher süßer Früchte usw., Moskau 1907 u. Compt. rend., 1907, CXLIII, S. 222.

[2]) D. Stscherbatscheff, Beitr. z. Entw. einiger offiz. Pflanz., Arch. d. Pharm., 1907, CCXLV, S. 48.

[3]) O. Tunmann, Mitteilungen aus der Pflanzenmikrochemie, Apoth.-Ztg., 1913, XXVIII, S. 771.

[4]) T. F. Hanausek, Über ein neues Vorkommen der „Inklusen" in dem Blatte von Pistacia Lentiscus usw., Ber. deutsch. bot. Ges., 1914, XXXII, S. 117.

[5]) E. Senft, Über die sog. „Inklusen" in der Glycyrrhiza glabra L." und über ihre Funktion, Ber. deutsch. bot. Ges., 1916, XXXIV, S. 710.

[6]) W. Himmelbauer, Eine Rhizoctonia-Erkrankung des Süßholzes, Zeitschr. landwirtschaftl. Versuchswesen in Österreich, zit. nach Senft.

Netolitzky[1]) rechnet auch die Inhaltsmassen der Gerbstoffschläuche des Hollundermarkes zu den Inklusen.

In den Blättern der Sempervivum- und Echeveria-Arten fand Brenner[2]) vornehmlich subepidermal große stark lichtbrechende Zellen mit großen Zellkernen, kleinen und wenigen Chlorophyllkörnern. Gerbstoffreaktionen fielen positiv aus. Schultzes Mazerationsgemisch gibt gelbe, Osmiumsäure schwarzgraue Färbung, Kupferoxydammoniak dunkelbraunen Niederschlag, Safranin und Cyanin werden gespeichert. Jod-Schwefelsäure gibt goldgelbe Klumpen, Kalilauge und Natronlauge blaue Ballen. Letztere werden durch Schwefelsäure entfärbt, es entsteht ein rotbrauner, schließlich dunkelbrauner Niederschlag. Salpetersäure, auch Essigsäure, färben die dunkelblauen Massen hellrot, hellviolett, braun, Borsäure schwarzblau, violett, braun. Sie reagieren nach Klemm[3]) mit Vanillinsalzsäure. Da sie aber Eiweißreaktionen (Raspailsche Reaktion) geben und da bei Sedum dendroideum ähnliche Zellen Gerbstoff-Reaktionen geben, aber nicht mit Natronlauge blaue Ballen liefern, so sollen die Reaktionen nach Brenner auf Eiweiß deuten.

Die Inklusen entstehen nach Griebel[4]) bei einer Reihe von eßbaren Früchten dadurch, daß die bei der Nachreife oder beim Teigigwerden eintretende vermehrte Bildung von Azetaldehyd das Plasma der Gerbstoffidioblasten tötet und den Gerbstoff in eine unlösliche Form überführt. „Der durch Koagulation entstandene, von der Zellwand zurückgezogene und in indifferenten Lösungsmitteln unlösliche Einschlußkörper ist die sog. Inkluse."

Die Inklusen entstehen sehr frühzeitig, bei Ceratonia schon in 1 cm langen Früchten (Hällström), bei Blättern (Rhamnus) in der Knospe. Die betreffenden Idioblasten zeichnen sich in der Jugend durch große Zellkerne aus, sind plasmareich und heben sich vom benachbarten Parenchym durch ihre Größe ab (meist rundlich, doch auch länglich, sogar sehr langgestreckt); ihr Inhalt hat selbst in der lebenden Zelle ein starkes Lichtbrechungsvermögen. Plasmolysiert man die Protoplasten, dann läßt sich bei schnellem Zusatz von Vanillinsalzsäure

[1]) F. Netolitzky, Notizen über „Inklusen" in Gerbstoffidioblasten, Österr. bot. Zeitschr., 1914, LXIV, S. 407.

[2]) W. Brenner, Untersuchungen an einigen Fettpflanzen, Basler Dissertation, 1900, S. 14.

[3]) P. Klemm, Über *die Aggregationszustände in Crassulaceenzellen*, Ber. deutsch. bot. Ges., 1892, X, S. 237.

[4]) C. Griebel, Über die bei der Nachreife oder beim Teigigwerden bestimmter Früchte eintretenden Veränderungen des Gerbstoffs (Inklusenbildung), Zeitschr. Unters. Nahrgs. u. Genußm., 1925, XLIX, S. 94.

oder Kalilauge (Natronlauge) eine rote (resp. eine blaue) Fällung mit Sicherheit in den Vakuolen verfolgen. Die Phloroglykotannoide bilden sich demnach in normaler Weise im Zellsaft.

Tunmann[1]) hat die Inklusenbildung an den Früchten von Rhamnus cathartica und Glycyrrhiza glabra untersucht und macht darüber folgende Angaben: Die Zellen sind vom jüngsten Stadium an dicht mit Phloroglykotannoiden erfüllt. In einigen jüngeren Stadien ist vorübergehend eine quellbare schleimige Substanz vorhanden, die nicht mehr nachweisbar ist, wenn Kelch und Blumenkrone dem Abfallen nahe sind. Die Phloroglykotannoide findet man dann vorzugsweise im Innern der Zellen, während an der Membran eine homogene, sehr zähe Substanz bassorinartiger Natur zur Ausbildung gelangt, die zu dem sog. Kerngummi zu zählen ist. Schreitet die Bassorinproduktion weiter fort, so entstehen solide Körper, bleibt sie auf den Rand beschränkt, so kommt es zur Bildung von Säcken. Immer aber werden die Phloroglykotannoide von der bassorinartigen Grundsubstanz in ungemein fester Weise gebunden. Der Vorgang bei der Inklusenbildung ist nach Tunmann der gleiche wie bei der Bildung des sog. Kerngummis der Gefäße und Tracheiden.

Fig. 86. Inklusen aus Rhamnus cathartica (a), Ficus carica (b), Phoenix dactylifera (c) (Tunmann)

Die erstarrten Inklusen lösen sich von der Membran ihrer Zellen ab, an ihrer Außenseite oft Membranabdrücke (Tüpfel) zeigend. Zuweilen scheint es zu einer undeutlich kristallinischen Ausscheidung zu kommen, indem Lamellen durch eine Beisubstanz verkittet werden (Fig. 86). —

Die Inklusen zeigen jedoch bei den verschiedenen Pflanzen durchaus nicht übereinstimmende Zusammensetzung. Der gebundene Gerbstoff weist ein verschiedenes Verhalten auf, Ferrichlorid färbt teils blau (Ceratonia), teils grünlichschwarz (Phoenix). Doch kann die verschiedene Färbung bei der Eisenreaktion auf der Anwesenheit verschiedener Säuren beruhen (Zitronensäure s. Gerbstoffe, S. 378). An

[1]) O. Tunmann, Mitteilungen aus der Pflanzenmikrochemie, Apoth.-Ztg., 1913, XXVIII, S. 771.

getrocknetem und konserviertem Material sind die Farben, die auch von der Dicke der Massen modifiziert werden, etwas verschwommen. Das weiteren wechselt die Zusammensetzung der Substanz mit der Entwicklung; im allgemeinen ist sie in jugendlichen Organen lebhaft gefärbt und ist auch leichter löslich als in älteren. Ebenso variiert die Reaktion mit Millons Reagens; in jungen lebenden Idioblasten erzielt man sehr oft rote Färbung, bei Sempervivum fast stets, in alten überwiegend nur grünlichblaue Färbung. Auf diese Weise sind die Abweichungen beim Ausfall der einzelnen Reaktionen zu erklären. Immer fallen aber die Hauptreaktionen annähernd übereinstimmend aus; die blaue bis rötliche Färbung mit Kali- oder Natronlauge, die übrigens von der Konzentration der Lauge (Solla)[1]) und ebenfalls vom Alter der Inklusen bedingt wird, sowie die Rotfärbung mit Vanillinsalzsäure.

Während alle Autoren ihre Untersuchungen lediglich auf organische Körper der Inklusen ausdehnen, geht Solla außerdem auf anorganische Stoffe ein, gibt aber leider nur an, daß beim Glühen eine amorphe, aus organischer Substanz bestehende Masse zurückbleibt. In dieser Richtung sind weitere Untersuchungen erforderlich, die von Blättern der Frangula-, Echeveria- und Sempervivum-Arten ausgehen müßten.

Phlobaphene

Phlobaphene nennt man Stoffe, die aus den Gerbstoffen durch Oxydation und Kondensation entstehen. Sie sind in den üblichen Lösungsmitteln meist unlöslich. Auch die Gerbstoffrote rechnet man vielfach dazu.

Bei den mikrochemischen Beobachtungen ist in der Regel neben den Gerbstoffen nicht besonders auf Phlobaphene geachtet worden, so daß nur wenige besondere Beobachtungen über sie vorliegen.

R. Schaede[2]) wies ein Phlobaphen in den Markstrahlzellen der Wurzeln und der unteren Teile des Stammes der Platane (Platanus acerifolia) nach.

Interessant ist der Befund von Molisch[3]), der beobachtete, daß braune Ballen in der Epidermis und darunter gelegener Zellen gold-

[1]) R. F. Solla, Sopra alcune speciali cellule nel carrubo, Malpighia, 1893, VII, S. 209.

[2]) R. Schaede, Über ein Phlobaphen in den Wurzeln der Platane, Ber. deutsch. botan. Gesellsch., 1928, XLVI, S. 298.

[3]) H. Molisch, Über den braunen Farbstoff „goldgelber" Weinbeeren, Ber. deutsch. bot. Ges., 1916, XXXIV, S. 69.

gelber Weinbeeren aus einem Phlobaphene bestehen, das unter dem Einfluß des Lichtes aus Gerbstoff entsteht.

Bei der Vacuum-Sublimation der Früchte von Mespilus germanica, Phoenix dactylifera und Ceratonia siliqua erhielt Niethammer kristallinische Sublimate, die sie für die glykosidischen Tannoide hält (Ztschr. Untersuchg., Lebensm., 1930, LIX, S. 418.

Bitterstoffe, Zellsaft-Farbstoffe von Phanerogamen u. dgl.

Stoff aus Actaea spicata

Aus Rhizomen und Wurzeln von Actaea spicata erhält man in der ersten und zweiten Fraktion charakteristische Sublimate[1]).

Alkannin

Alkannin ist bei den Boraginaceen in den Wurzeln weit verbreitet. Pulitzer[2]) fand es in rund 150 Arten von 736 nicht baum- und strauchförmigen, am reichlichsten bei den Boraginoideae-Anchuseae, den Boraginoideae-Lithospermoideae und den Boraginoideae-Echieae. In den oberirdischen Organen fehlt es.

Dunkelrote, grünlich glänzende Krusten, die unter 100° erweichen. Löslich am besten in Eisessig und Chloroform, ferner in Alkalien. Aus der blauen alkalischen Lösung wird es durch Säuren wieder ausgefällt. Aus seiner weingeistigen Lösung fällt Bleiessig einen blauen, Ferrichlorid einen dunkelvioletten, Quecksilberchlorid einen fleischfarbigen und Zinnchlorür einen karmoisinroten Niederschlag.

Das Alkannin wird im Zellinhalt der lebenden Oberhautzelle schon im allerjüngsten Stadium des Keimlings gebildet, durchdringt die Zellhaut, wobei es die Interzellularen und Mittellamellen ausfüllen kann und tritt dann auf die Außenwand der Zellhaut.

Die Bildung des Alkannins wird durch Dunkelheit gefördert und kann durch Verwundung an bestimmten Stellen hervorgerufen werden. In diesen Fällen kann auch das Parenchym Alkannin bilden.

In den Zellen erscheint das Alkannin in Tropfen oder Schollen teils in der Zelle, aber nicht mit dem Plasma vermischt, teils der Innenseite der Membran angelagert, teils innerhalb der Interzellularen oder schließlich (s. oben) der Außenseite der Membran aufgelagert.

Nach Wilczek[3]) ist Alkannin weder bei Alkanna noch bei Echium präformiert.

[1]) Z. Zawalkiewicz, Beiträge zur Anatomie und Mikrochemie der unterirdischen Organe der Gattung Helleborus, Pharmaz. Post, 1918, LI, S. 753.

[2]) G. Pulitzer, Über die Verbreitung des Alkannins bei den Boragineen und sein Auftreten in der Pflanze, Österr. bot. Zeitschr., 1915, LXV, S. 177.

[3]) E. Wilczek, Bemerkungen über zwei neue alkanninhaltige Pflanzen, Schweiz. Apoth.-Ztg., 1924, LXII, Sonderbeilage Dezember 1924, S. 14.

Zur Bestimmung der Lokalisation entfernt Eriksson[1]) zunächst Harze und Fette „durch kalte Verseifung mit Alkali und darauffolgendes Auswaschen mit Wasser". Der reine Farbstoff bleibt blau fixiert im Zellinhalt und tritt nach Behandlung mit Salzsäure rot gefärbt hervor.

Bei der Mikrosublimation erhält man tiefrote Tropfen, die mit Alkali blau, bei nachfolgendem Säurezusatz rot werden. Dieses aus der Wurzel auf einfachste Weise gewonnene reine „Alkannin" kann zur Herstellung der Farbstofflösungen (S. 353) dienen. Nach einiger Zeit schießen aus den Tropfen lange Spieße hervor. Tropfen und Nadeln sind nicht einheitlicher Natur. Anilin löst sofort den Farbstoff, eine farblose Grundsubstanz tritt hervor, die sich erst nach einiger Zeit löst.

Andromedotoxin

Andromedotoxin, von Plugge (Arch. d. Ph., 1883) in Andromeda-Arten aufgefunden, wahrscheinlich identisch mit dem Asebotoxin Eijkmans, ist ein noch wenig erforschter stickstofffreier Körper; er ist löslich in Weingeist, Chloroform, verd. Alkalien, wird mit Schwefelsäure rotbraun, mit Salzsäure grünblau, violett, mit Salpetersäure gelb, mit Froehdes Reagens dunkelblau, mit Phosphorsäure rotviolett. Der Körper ist stark giftig und bildet eine amorphe weiße Masse.

Der mikrochemische Nachweis[2]) ist durch die Gegenwart von Gerbstoff und Quercetin sehr erschwert. Da das Andromedotoxin nur sehr mangelhaft erforscht ist, so können zum Nachweis nur folgende Reaktionen dienen: Durch Wässern werden aus den Schnitten Gerbstoffe und Zucker möglichst entfernt. Die gewässerten und dann getrockneten Präparate werden 1—2 Tage den Dämpfen von Salzsäure ausgesetzt (feuerrote Klumpen). Wird auf die vorbehandelten Schnitte etwas Phosphorsäureanhydrid gebracht und schwach erwärmt, so bilden sich violettrote Ballen in den Zellen. Die mit konzentrierter Salzsäure eintretende grünblaue Färbung ist wenig beweisend. Andromedotoxin findet sich im Blatte (Schwamm- und Nervenparenchym, Spuren in Epidermis, nicht in den Palisaden), weniger im Stengel (primäres Rindenparenchym, Spuren in den Markstrahlen), am reichlichsten in den basalen Teilen der Blüte (Karpellblätter, Samenknospen). Es tritt nicht nur in Andromeda-Arten, sondern auch in Azalea-, Kalmia- und Rhododendron-Arten auf, sowie nach mikrochemischen Befunden in Menziesia, Bruckenthalia und Pernettya.

Azafranin

Azafranin (Altamirano), der Farbstoff von Escobedia scabrifolia und linearis, ist von C. Liebermann (Ber. chem. Gs., 1911, XLIV, S. 850) aus dem

[1]) E. Eriksson, Über die Alkannawurzel und die Entstehung ihres Farbstoffes, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1910, XX, S. 202.

[2]) O. Tunmann, Über den Nachweis und die Lokalisation des Andromedotoxins in Ericaceen, Apoth.-Ztg., 1911, XXVI, S. 555.

Benzolauszug in orangeroten Nädelchen erhalten worden (stickstofffrei). Der Farbstoff ist im gesamten Rindenparenchym, im Zellsaft gelöst, lokalisiert. In der Droge bildet er formlose, rotorangefarbene Massen. Azafranin kann in der Mikrochemie den Alkannafarbstoff vertreten.

Die Azafranin führenden Massen sind nach Lendner[1]) unlöslich in Wasser, Glyzerin, Paraffinöl, sehr wenig löslich in Xylol; sie lösen sich leicht in Weingeist, Chloroform, Eisessig, Äther, sowie langsam in kaltem, schnell in heißem Olivenöl. Konzentrierte Schwefelsäure färbt blau, dann graublau oder violett, Salpetersäure blau, dann vorübergehend grün, schließlich gelb, Salzsäure sofort gelb. Aus der Farbstofflösung wird durch Bleiazetat, Sublimat oder Chlorzink ein gelber Niederschlag gefällt. Oxydationsmitel (Chromsäure, Kaliumpermanganat u.a.) entfärben die Lösungen. Schnitte werden durch Azafranin in gleicher Weise wie durch Alkannin gefärbt, spektroskopisch zeigen aber beide Farbstoffe ein verschiedenes Verhalten.

Betulin

Betulin (Betulakampfer), aus der mit Wasser extrahierten Rinde von Betula alba durch Behandeln mit heißem Weingeist gewonnen, bildet farb- und geruchlose Nadeln F. 251°, die beim Erhitzen nach Leder riechende Dämpfe entwickeln. Betulin kommt nicht nur in den weißen Schichten der Birkenrinde (12—14,1 %) vor, sondern auch in großer Menge in den tiefer liegenden rötlichweißen Partien der Rinde (11,9—13,1 %). In den braunen bis schwarzen Lamellen findet es sich in geringerer Menge (bis 1,4 %, Tunmann)[2]).

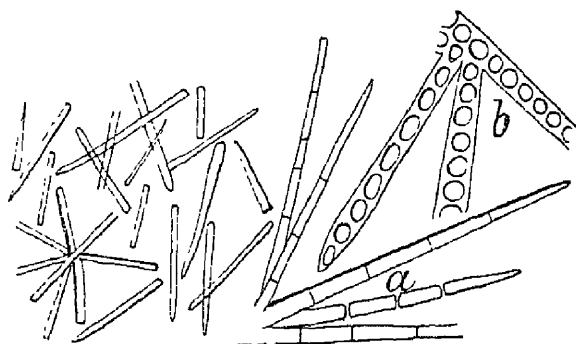



Fig. 87. Betulinkristalle aus dem Sublimat von Betula alba (Kork), bei *a* größere Kristalle, die in einzelne Teile zerbrechen, bei *b* Kristalle bei Einwirkung von Schwefelsäure (Tunmann)

Der Nachweis gelingt leicht durch Mikrosublimation; derart kann man Betulin in annähernd quantitativer Ausbeute gewinnen (s. oben). Bereits Präparate von 5—10 mg geben starke kristallinische Sublimate. Bei Anwendung von 0,01 g Material ist das Sublimat mit bloßem Auge deutlich zu erkennen. Man sublimiert gleich bei größerer Flamme (bei über 100°). Kurze Zeit nach dem Abkühlen läßt sich leicht erkennen, ob sämtliches Betulin aus den Präparaten heraussublimiert ist.

[1]) A. Lendner, Une racine tinctoriale, l'Escobedia scabrifolia R. et P., Schw. Wchschr. f. Chem. u. Pharmaz, 1912, L, Nr. 18.

[2]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie des Betulakampfers, Apoth.-Ztg., 1910, XXVI, S. 344.

An denjenigen Präparaten, die noch Betulin enthalten, scheidet sich dieses auf der Oberfläche als feiner, weißer, federartiger Belag ab (wie der Vanillinbelag an Vanilleschoten). Die bei der Mikrosublimation zunächst entstehenden Kristalle sind feine Prismen, welche anfangs einzeln liegen, sich aber bald zu Gruppen (Sternen, Drusen, baum- und strauchartigen Gebilden) vereinigen und schließlich untereinander verflechten. Dann bilden sich längere Nadeln, die bisweilen schwach gebogen sind, und zuletzt entstehen derbe Spieße mit schwach zugespitzten Enden (Fig. 87). Die langen Kristalle brechen nach einiger Zeit quer durch. Bei gleichgerichteten Nadeln geht der Bruch über mehrere Nadeln in gerader Richtung hinweg. Die Bruchlinien laufen parallel. An diesen Stellen fallen die Kristalle auseinander und stellen dann kurze derbe Säulen dar. Die Kristalle lösen sich unter Deckglas leicht in Anilin, schwerer in wässeriger Chloralhydratlösung, Eisessig und heißem Benzol. In Wasser, Weingeist, Petroläther, Schwefelkohlenstoff, Chloroform, Äther sind sie unter Deckglas selbst beim Erwärmen nur zum Teil in Lösung zu bringen. Vanillinsalzsäure und Salpetersäure lösen gleichfalls nur zum Teil und bilden ölige schmierige Massen. Konzentrierte Schwefelsäure erzeugt unter Gelbfärbung an den größeren Kristallen eine recht charakteristische Vakuolenbildung, die lange Zeit bestehen bleibt (Fig. 87).

Im Gewebe findet sich Betulin im Inhalt der Korkzellen als amorphe eingetrocknete Klumpen oder als kleinkörnige, krümelige Massen, die mit Schwefelsäure schwache Gelbfärbung geben.

Mit Hilfe des von Tunmann angegebenen Nachweises durch Mikrosublimation konnte Kobert[1]) ein altes, sehr wertvolles Rindenpapier als Birkenrinde identifizieren. Das Betulin hat sich über 1000 Jahre unverändert erhalten.

Brasilin

In den Hölzern von Caesalpinia brasiliensis Sw., echinata Lam. und Sappan L.

Bernsteingelbe Kristalle oder farblose Nadeln. Löslich in Wasser, Weingeist und Äther. Alkalien lösen mit karminroter Farbe.

Über die Lokalisation fand Kisser folgendes:

Sämtliche Elemente des Holzkörpers von Caesalpinia echinata und C. Sappan erscheinen in Wasser oder Glyzerin leuchtend orange gefärbt. Zahlreiche gelbrote, braunrote bis rotbraune Massen liegen in den Gefäßen. Der Inhalt der Parenchym- und Markstrahlzellen, nicht der der Gefäße löst sich in Alkali mit typischer (karminroter) Farbe.

[1]) R. Kobert, Über das älteste in Deutschland befindliche echte Papier, Der Papierfabrikant, Festheft, 1911.

Caryophyllin

Ein Bestandteil der Nelken. Seidenglänzende farb- und geruchlose Nadeln, die bei 285° sublimieren. Unlöslich in Wasser und Alkalien, wenig in Weingeist, leicht in Äther löslich.

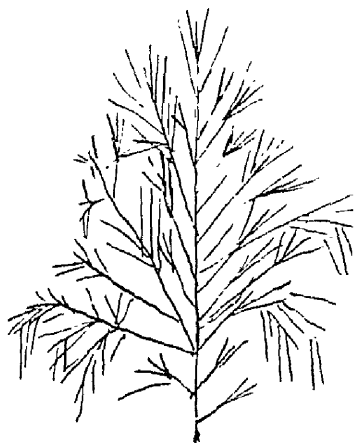



Fig. 88. Caryophyllin (Sublimat)

Ist nach van der Haar identisch mit dem Zuckerrübensapogenin und der Oleanolsäure aus Olivenblättern.

Erhitzt man Nelkenpulver bis zur beginnenden Verkohlung, so treten neben den angeschwärzten Teilchen zahlreiche Nadelbüschel von Caryophyllin auf, die dann sublimieren und ein Sublimat aus strauchartig verzweigten Nadeln (Fig. 88) neben Körnchen liefern. Man erhält sie auch aus den Nelkenstielen[1]).

Columbin

Columbin (Wittstock, 1830), das Lakton der Kolumbasäure kommt in Wurzeln der Menispermaceen vor (in Jatrorrhiza palmata 0,8 %, Tinospora cordifolia 2,2 %, T. Bakir 3 %).

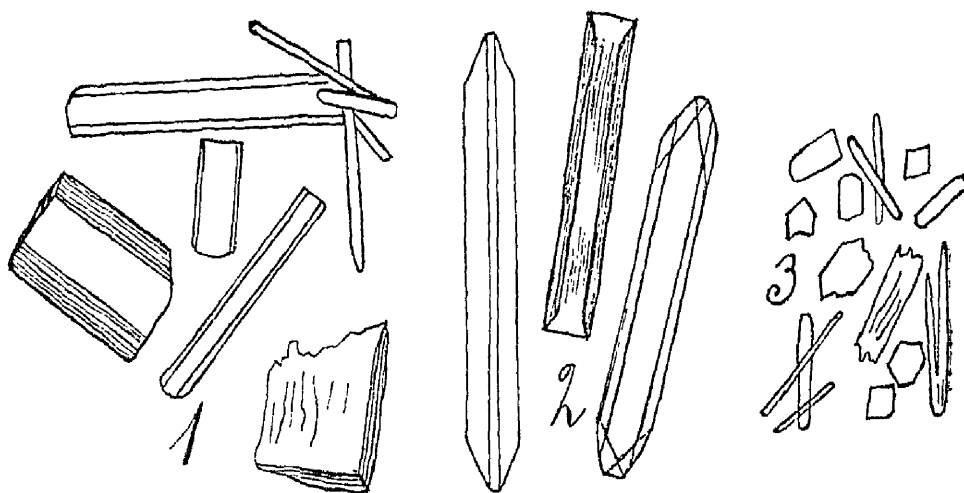



Fig. 89. 1. Chemisch reines Columbin. 2. Columbin mit heißem Glyzerin umkristallisiert. 3. Columbin mit Chloroform am Objektträger umkristallisiert (Tunmann)

Columbin bildet Prismen, die dem orthorhombischen System angehören, F. 182°. Unlöslich in Wasser, Schwefelkohlenstoff, Ligroin, Toluol, schwer in kaltem Äther und Weingeist, leichtlöslich in heißem Weingeist, Methanol, Äther usw.

Zum Nachweis des Columbins in der Droge bringt man nach Tunmann[2]) ungefähr 0,3 mg auf den Objektträger und läßt nach Auf-

---

[1]) L. Rosenthaler, Chemische Charakterisierung von Drogen, Pharmac. Acta Helv., 1926, I, S. 72.

[2]) O. Tunmann, Über die Calumba-Wurzel, Pharmazeut. Zentralh., 1914, LV, S. 775.

legung des Deckglases Essigäther zufließen. Man mischt durch einmaliges Heben des Deckglases. In wenigen Augenblicken läßt sich am Deckglasrande die Bildung zahlreicher bis 100 μ langer und bis 20 μ breiter Prismen verfolgen, die sich bald zu sternförmigen Gruppen oder bündelförmig zu Besen vereinigen. Hier und da erscheinen Nadeln und Täfelchen. Die Kristalle (Fig. 89 u. 90) lösen sich in Schwefelsäure mit rotbrauner Farbe; nach einiger Zeit scheiden sich Flocken ab, die bei makroskopischer Betrachtung grünlich erscheinen.

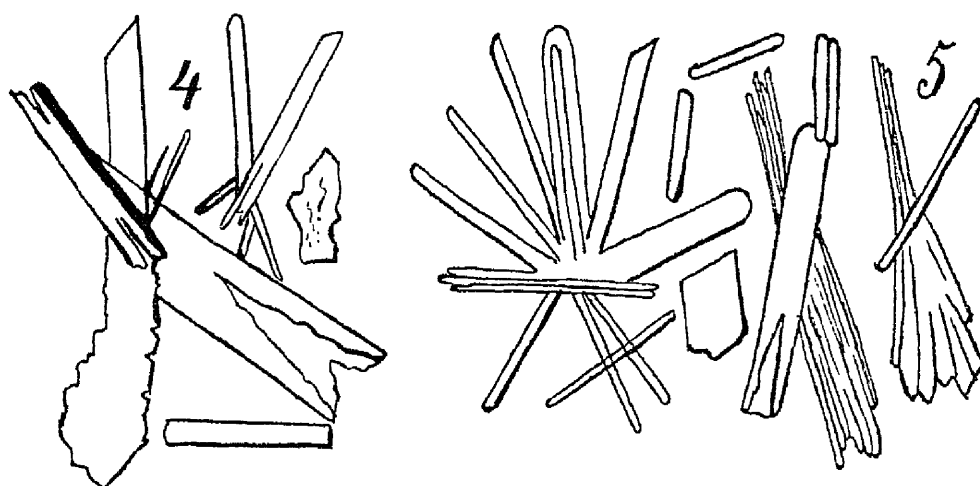



Fig. 90. 4. Mit Essigäther am Objektträger umkristallisiertes chemisch reines Columbin. 5. Mit Essigäther unmittelbar aus dem Drogenpulver unter Deckglas erhaltene Columbinkristalle (Tunmann)

Nach Bödeker sollte sich Columbin in Jatrorrhiza palmata in kristallinischer Form in der Innenrinde der Wurzel finden, eine Angabe, die Tunmann nicht bestätigen konnte. Rundquist ist dann auf den Nachweis eingegangen und hat die Schnitte mit Essigsäure behandelt und nachher in Schwefelsäure eingelegt. Rotfärbung soll Columbin in der Nähe des Kambiums anzeigen. Derart erhielt Tunmann wiederholt nur eine rotbraune Färbung, die nach einiger Zeit verging. Die Färbung war allerdings am stärksten am Kambium; sie trat aber außerdem im gesamten Parenchym auf, am schwächsten in der Außenrinde. Fast ausschließlich waren die Zellwände gefärbt, was jedenfalls mit der Methode zusammenhängt.

Derrid (Rotenon, Tubatoxin)

Derrid (Greshoff 1890) in der Wurzelrinde von Derris elliptica Bth., Lonchocarpus violaceus, Mundelea suberosa und in dem wahrscheinlich von Tephrosia toxicaria stammenden peruanischen Fischgift „Cube".

Tafeln oder Nadeln F. 163°. Unlöslich in Wasser, leichtlöslich in Weingeist, Äther, Chloroform und Petroläther, sowie in Alkalien, in diesen mit gelber Farbe. Reduziert alkalische Kupfer- und ammoniakalische Silberlösung. Gibt ein Phenylhydrazon F. 243—244°, ein Hydrazon F. 258° und ein Oxim F. 249[1]).

[1]) Über die Eigenschaften des Derrids s. A. Butenandt, Annal. Chem., 1928, CCCCLXIII, S. 253; Takei, Ber. deutsch. chem. Ges., 1928, LXI, S. 1003.

In Derris elliptica ist es hauptsächlich in den Markstrahlen und in der Nähe des sklerotischen Ringes lokalisiert, viel weniger im Holz (Hartwich und Geiger)[1]; mit konzentrierter Schwefelsäure und einer Spur Ferrichlorid gibt es eine blutrote Farbe.

Embeliasäure (Embelin)

Embeliasäure (Scott, Warden, 1888, Heffter, Feuerstein, Arch. d. Pharm., 1900) soll ein Oxychinonderivat sein und kommt im Samen von Embelia ribes Burm. vor. In getrocknetem Material ist Embeliasäure ausschließlich in den bis zur Mitte der Samen reichenden Ruminationszapfen in Gestalt gelblicher Klumpen enthalten, die aus gelblichen Kristallblättchen F. 142° bestehen. Die Kristalle lösen sich in Äther mit gelber, in verdünnter Kalilauge mit rotvioletter Farbe. Bei Zusatz von überschüssiger Kalilauge scheiden sich aus der violetten Lösung große rotviolette Nadeln aus, die sternförmige Gruppen bilden. Die feinen Nadeln sind bisweilen gebogen (Wéber)[2]. — Embeliasäure gibt mit konzentrierter Schwefelsäure erwärmt eine violette Färbung. Sublimierbar.

Heyl und Kneip[3]) erhielten durch Sublimation der Früchte von Embelia ribes teils drusenähnliche, teils tafelförmige von einer gelblichen Masse umgebene Kristallgebilde. Die Sublimate gaben außer der oben erwähnten Reaktion mit Lauge noch folgende Reaktionen: In verdünntem Ammoniak lösten sich die Kristalle mit hellrötlicher Farbe auf; beim Verdunsten der Lösung schieden sich allmählich kleine Drusen ab. Die wässerige alkalische Lösung der Sublimate gab mit verdünnter Kupfersulfatlösung eine olivbraune, mit verdünnter Baryumchloridlösung eine graubraune, mit verdünnter Nickelsulfatlösung eine grünbraune, mit verdünnter Kobaltnitratlösung eine grünbraune und mit verdünnter Magnesiumsulfatlösung eine flockige bräunliche Fällung.

Die weingeistige Lösung der Sublimate gab mit verdünnter Ferrichloridlösung einen rotbraunen, mit verdünnter Kuprinitratlösung einen schmutzig grünen, mit verdünnter Bleiazetatlösung einen dunkelgrünen und mit verdünnter Zinkchloridlösung einen violetten Niederschlag. Durch Merkurichlorid- und Silbernitratlösung werden keine Fällungen hervorgerufen.

[1]) C. Hartwich u. P. Geiger, Beiträge z. Kenntnis d. Ipoh-Gifte und einiger zu ihrer Herstellung verwendeter Pflanzen, Arch. d. Pharm., 1901, CCXXXIX, S. 491.

[2]) D. Wéber, Beitr. z. Anat. pharmakognostisch wichtiger Samen und Früchte, Berner Dissertation, 1907, S. 61.

[3]) G. Heyl u. P. Kneip, Apotheker-Ztg., 1913, XXVIII, S. 699.

Farbstoffe von Frasera carolinensis

In Wurzel, Samen, Blumenblättern, weniger in den Laubblättern kommen Farbstoffe vor (Kennedy, Trimble und Lloyd), die sich wie Tunmann[1]) gezeigt hat, unmittelbar aus den Pflanzenteilen sublimieren lassen. Man erhält gelbe Tropfen, die mit Äthylalkohol oder Methanol Kristalle geben und zwar erstens lange, flache, prismatische, an den Enden zugespitzte zitronengelbe Kristalle, zweitens sehr zarte fahlgelbe, gebogene Kristallfäden, die Kristallklumpen bilden, drittens kleine orangefarbige schön entwickelte Sphärite. Aus den Samen erhält man unmittelbar Kristalle (Fig. 91). Über Derivate s. die Arbeit von Tunmann.

Fig. 91.
Kristallformen des Farbstoffes aus dem Sublimat der Samen von Frasera carolinensis (Tunmann)

Ferrichlorid färbt die weingeistige Lösung dunkelgrün; Alkalien, besonders weingeistige Kalilauge, und Schwefelsäure färben und lösen gelb bis orange. Ein Gemisch gleicher Tropfen Schwefelsäure und Salpetersäure gibt eine schnell kirschrot werdende Lösung.

Mit letzterer Reaktion hat Tunmann die Lokalisation untersucht. Der Sitz der Farbstoffe ist in der Wurzel das Parenchym, im Blumen- und Kelchblatt die Epidermis und das Mesophyll, wobei sich regellos zerstreute Zellen durch besonders hohen Farbstoffgehalt auszeichnen. Im Gewebe der Nektardrüsen sollen die gelben Farbstoffe mit einem bräunlichen gemischt sein.

Im Samen enthalten die Keimblätter in jeder Zelle der Epidermis und des Mesophylls die Farbstoffe.

Gelseminsäure

Gelseminsäure (β-Methylaesculetin) bildet blaßgelbe Nadeln F. 199° und kommt in den Wurzeln und Ausläufern von Gelsemium sempervirens vor, sowie in verschiedenen Solaneen (Scopolia- und Atropa-Arten).

Bei Gelsemium sempervirens läßt sich die Gelseminsäure durch Sublimation nachweisen (Tunmann, Ap.-Ztg., 1911), die zugleich das

[1]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie des Gentisins und der gelben Farbstoffe in Frasera carolinensis, Apoth.-Ztg., 1916, XXXI, Nr. 32 u. 33.

einfachste Verfahren ist, G. sempervirens von den ähnlich gebauten Achsen und Wurzeln von G. elegans zu unterscheiden. Ein kleiner Schnitt der Rinde genügt zur Reaktion. Die Kristalle, besonders in den ersten Sublimaten, sind farblos (bei durchfallendem Lichte), entstehen bereits während der Sublimation und polarisieren lebhaft in allen Farben (gelb, rot, grün). Einige Kristalle sind nadelförmig und löschen schief aus, die meisten sind flach säulenförmig mit geraden Enden (nicht zugespitzt) und löschen parallel zur Längskante aus (letztere können bis 100 μ lang werden) (Fig. 92). Die Kristalle sind unter Deckglas in kaltem Wasser und Azeton unlöslich, sie lösen sich leicht in Alkalien (gelb), zum Teil (bei mehrmaligem Durchsaugen) in Alkohol. In heißem Wasser sind sie ebenfalls löslich. Die wässerige Lösung zeigt eine tief blaugrüne Fluoreszenz, die selbst beim geringsten Sublimat beim abwechselnden Halten des Objektträgers über weiße und schwarze Unterlagen sichtbar ist, bei Zusatz von Salzsäure verschwindet, um bei Zusatz von Kalilauge wieder einzutreten. Die Reaktion mit Salpetersäure-Ammoniak, die bei ganz schwachen Sublimaten (von 0,001 g Droge) eintritt, ist wie folgt durchzuführen: Das Sublimat wird mit dem Deckglase bedeckt, auf einer Seite wird etwas Ammoniak zugesetzt, so daß die vordringende ammoniakalische Lösung nicht ganz den anderen Rand des Deckglases erreicht. Dort setzt man einen kleinen Tropfen Salpetersäure zu. Sowohl die ammoniakalische, blau fluoreszierende Lösung als auch die Lösung der Säure haben gelbe Ränder. Verschiebt man nun das Deckglas, so daß beide Tropfen sich berühren, dann entsteht sofort an der Berührungsstelle eine tief blutrote Zone. Bei G. sempervirens ist Gelseminsäure in den Wurzeln, Rhizomen und Ausläufern nachweisbar und zwar in Holz und Rinde. Wurzelfasern von 0,5 mm Durchmesser geben die Reaktion bereits.

Fig. 92.
Mikrosublimat von Gelsemium sempervirens (Wurzel, Rhizome, Stengel) meist Gelseminsäure (Tunmann)

Läßt man die Sublimate längere Zeit liegen, dann werden die großen Nadeln hellgelb; außerdem bleiben weiße Kristalle bestehen. Die Sublimate sind oft nicht einheitlicher Natur. Zuweilen entstehen Kristalle, die sich im Gegensatz zur Gelseminsäure in Äther selbst unter Deckglas lösen und wahrscheinlich abgespaltenes Aesculetin darstellen. In den letzten Sublimaten sind Fette zugegen, die in der Kalilösung als glänzende Tropfen erscheinen und Spuren von Alkaloid führen.

Gentisin[1])

Gentisin ist ein in den unterirdischen Teilen von Gentiana-Arten vorkommender Farbstoff, der Methyläther eines Trioxyxanthons. Gentisin F. 267° besteht aus sehr schmalen und langen hellgelben rhombischen Prismen mit ebenen Endflächen. Schwer löslich in Wasser und Äther, löslich in 450 Teilen kaltem und 60 Teile siedendem absolutem Alkohol. Sublimierbar.

Nitroverbindungen. Man versetzt die Kristalle oder das Sublimat mit je einem kleinen Tropfen Schwefelsäure und Salpetersäure und erwärmt nach dem Auflegen des Deckglases bis zur Blasenbildung. Die zunächst entstehenden Tröpfchen gehen bald in grüne bis blaugrüne 5—20 μ große Sphärite und Drusen über; später treten noch ähnliche chromgelbe Gebilde von Dinitrogentisin auf, bei den Sublimaten fast ausschließlich (Tunmann).

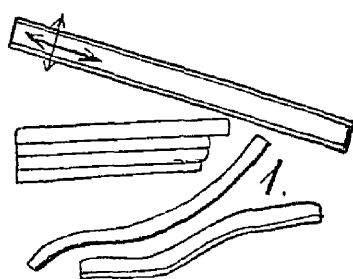



Fig. 93. Gentisin-Handelspräparat (Tunmann)

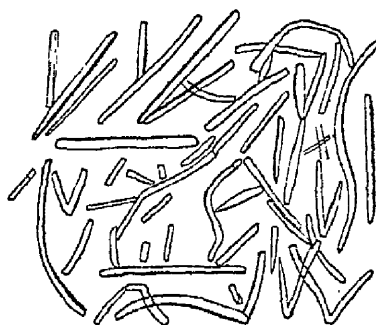



Fig. 94. Gentisinkristalle im Sublimat von Gentiana lutea (Wurzel) (Tunmann)

Bromverbindung. Durch kurzes Erwärmen von Gentisin mit einem Tropfen Bromessigsäure (Brom 1—2, Essigsäure 10) erhält man sehr zarte, meist gebogene, fahlgelbe Nadeln, die stets zu strauch- und büschelförmigen Aggregaten verwachsen sind (Dibromgentisin?) (Tunmann).

Der mikrochemische Nachweis ist mit Hilfe der Mikrosublimation zu erbringen[2]). Man erhält Gentisinsublimate bereits mit 0,05 g Enzianpulver, 0,8 g Enziantinktur und mit 0,06 g schweren Schnitten des getrockneten Rhizoms (Droge). Eine dreijährige Wurzel einer Kulturpflanze sowie eine lebende Blüte enthielten kein Gentisin. Die Gentisinkristalle sind im Sublimate nicht gleichmäßig verteilt, das Sublimationsfeld muß abgesucht werden. Anfangs entstehen kurze Prismen, ein Teil dieser wächst zu langen Nadeln aus, die überwiegend gebogen

[1]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie des Gentisins und der gelben Farbstoffe in Frasera carolinensis, Apoth.-Ztg. 1916, XXXI, Nr. 32 u. 33.

[2]) O. Tunmann, Beiträge z. angew. Pflanzenmikrochem., Gehe Ber., 1911, S. 160.

sind und unter Deckglas sich weder in Wasser (selbst beim Erwärmen) noch in Weingeist, in Äther, Essigsäure und Xylol lösen. Sie lösen sich in wässeriger Chloralhydratlösung und augenblicklich in Anilin (Fig. 94).

Der Gentisinnachweis kann zur Diagnose des Enzianpulvers dienen. Ist Enzianpulver mit dem Rhizom von Rumex alpinus verfälscht, dann sind im Sublimat neben je nach der Dicke fast farblosen oder hellgelben Gentisinprismen auch Anthrachinonderivate (Klumpen und spitze tiefgelbe Nadeln) zugegen. Weingeist läßt Gentisin ungelöst, während die Anthrachinonderivate sofort dunkelgelb gelöst werden (Tunmann, 1911).

Gentisin tritt im Wurzelstock und in der Wurzel am reichlichsten in den äußeren Teilen, nahe dem Phellogen auf, aber auch in den innersten Teilen. Es fehlt im Samen (Tunmann).

Gentiana-Stoffe unbekannter Natur

Durch Mikrosublimation getrockneter Laubblätter von Gentiana germanica und, wenn auch weniger, von Stengeln und Blüten, erhielt Molisch[1]) gelbe doppelbrechende Kristalle (Gentiolutein) verschiedener Form. Sie sind unlöslich unter anderem in wässerigem Chloralhydrat, Weingeist, Xylol, löslich in Azeton. Sie verwandeln sich unter dem Deckglas mit Anilin in gelbe Nadeln oder Nadelsterne. 10proz. Sodalösung läßt sie unverändert, Ammoniak korrodiert und löst sehr langsam, in Baryt- und Kalkwasser werden sie nach einiger Zeit tiefbraun, in Chlorkalklösung werden sie vorübergehend hell blaugrün und lösen sich schließlich.

Nicht damit identisch sind Kristalle, die man durch Mikrosublimation aus den Blättern von Gentiana ciliata erhält. Sie sind farblos, lösen sich rasch in Weingeist, Anilin und Kalilauge (10proz.), in letzterer mit gelber Farbe.

Bewahrt man die abgezogene Epidermis des Blattes von Gentiana germanica nach Einbetten in Wasser eine Stunde in einer feuchten Kammer, so bildet sich in einem Teil der Zellen ein feinkörniger bräunlicher, in eine sphäritische Masse übergehender Niederschlag; in anderen Zellen entsteht ein gelber, aus winzigen Ballen, kleinen Nadelsternen oder großen Sphäriten zusammengesetzter Niederschlag. Kristalle erhält man auch durch Weingeist, Glyzerin und Säuren.

Aus den Blüten von Gentiana purpurea und punctata erhielt Tunmann[2]) bei ungefähr 180° (wenn das Pflanzenpulver verkohlt

---

[1]) H. Molisch, Über organische kristallisierende Stoffe in Gentiana germanica Willd., Ber. deutsch. bot. Ges., 1917, XXXV, S. 653.

[2]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie des Gentisins und der gelben Farbstoffe in Frasera carolinensis, Apotheker Ztg., 1916, XXXI, Nr. 32/33.

war) ein Sublimat farbloser, flacher, prismatischer Ballen und Platten. Löslich in heißem Weingeist.

Chimaphilin

Gelbe sublimierbare Nadeln. F. 114°. Schwer in Wasser, leichter in Weingeist, Äther und Chloroform löslich.

Kommt in Chimaphila umbellata und einigen Pirola-Arten vor. Fischer und Linser (l. c. S. 409) erhielten es durch direkte Sublimation aus Pirola umbellata, durch Sublimation des Ätherextraktes (s. S. 38) aus Pirola rotundifolia.

Pimpinellin[1])

Von Buchheim 1872 in der Pimpinellwurzel entdeckt.

Aus stark verdünnter weingeistiger Lösung lange anscheinend rhombische asbestglänzende Nadeln. F. 106°, 117,5° (Tunmann).

In konz. Schwefelsäure mit lauchgrüner Farbe löslich; löst sich beim Erwärmen in sehr verdünnter Kalilauge.

Setzt man zu dem unter Deckglas befindlichen feinen trockenen Pulver von Pimpinellwurzel Petroläther, dann scheiden sich rasch am Deckglasrande Kristallnadeln von Pimpinellin ab. Die Kristalle löschen parallel zur Längsachse aus, zeigen lebhafte Polarisationsfarben, sind in kaltem und warmem Wasser unlöslich, lösen sich aber langsam bei wiederholtem Zusatz von kochendem Wasser. Mit Chlorzinkjod entstehen zahlreiche kleine aus feinen Nädelchen bestehende Büschel, Garben, Pinsel und Doppelpinsel der Jodverbindung. Die Kristalle sind meist gelb, seltener blau und polarisieren mit gelben Farben. Sie entstehen vereinzelt auch durch direktes Einlegen des Pulvers in Chlorzinkjod.

Pimpinellin erhält man auch durch Mikrosublimation. Das Sublimat läßt sich mit Pyridin in Nadeln umkristallisieren, die lebhaft in Blau, Grün und Violett polarisieren und parallel zur Längsachse auslöschen.

Das Pimpinellin ist im Holzkörper der Wurzel lokalisiert.

Hämatoxylin

Im Holz von Haematoxylon campechianum L. (Kampecheholz). Farblose quadratische Säulen oder rhombische Kristalle, die im Kristallwasser bei 100 bis 120° schmelzen. Schwer in kaltem Wasser löslich, leicht in heißem, in Weingeist und Äther.

Die alkalische Lösung wird (unter Bildung von Hämateïn) an der Luft blauviolett.

[1]) O. Tunmann, Über Radix pimpinellae, insbesondere über das Pimpinellin. Apother-Ztg., 1914, XXIX, S. 728.

Über die Lokalisation beobachtete Kisser folgendes:

Schnitte in destilliertem Wasser zeigen alle Elemente goldgelb bis orange gefärbt, kalkhaltiges Leitungswasser bewirkt baldige Verfärbung über violett in karmin. Innerhalb der leuchtend gelben Wände der Gefäße liegen häufig zahlreiche tief rotbraun leuchtende Massen. Die Markstrahlzellen sind häufig fast vollständig ausgefüllt. Im Strangparenchym ebenfalls braunrote amorphe Inhaltsmassen. Außerdem mehr oder weniger reichlich gefärbte Körnchen in allen Elementen.

Helichrysin

An dieser Stelle sei das Helichrysin, der gelbe Blütenfarbstoff der Helichrysum-Arten, eingefügt, dem Rosoll[1]) chinonartige Natur zuschreibt. Es ist aber ganz ungewiß, ob ein Chinonderivat vorliegt, ob es sich vom Anthracen oder vom Naphthalin ableitet; in glykosidischer Bindung wird es wohl nicht vorliegen. Klein rechnet das Helichrysin zu den Anthochloren (s. diese). Nach Rosoll soll Helichrysin an das Plasma (?) gebunden sein; es ist in Wasser, Äther, organischen Säuren (Essigsäure, Weinsäure, Oxalsäure) löslich, in Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Benzol unlöslich. Schwefelsäure und Alkalien geben eine purpurrote Farbenreaktion. Getrocknete Blüten werden in mit Salzsäure versetzter Boraxlösung getaucht: Die Blättchen des Hüllkelches werden rubinrot. — Die Mikrosublimation müßte Aufklärung bringen.

Lipochrome

Als Lipochrome faßt man gelbe bis rote Farbstoffe zusammen, die in der Zelle gemeinschaftlich mit Fetten auftreten und sich durch einige gemeinsame Reaktionen auszeichnen. Bei näherer Erforschung sind viele Lipochrome als Carotine erkannt worden; auch das Bixin (in Bixa Orellana) steht ihnen nahe. Jedenfalls ist die Gruppe der Lipochrome nur ein Notbehelf.

Mit der Mikrochemie der Lipochrome, die durch Schwefelsäure und Salpetersäure blau, durch Jodjodkalium grün gefärbt werden, hat sich Zopf[2]) beschäftigt. Der bei Einwirkung von Schwefelsäure entstehende blaue Stoff läßt sich zur Kristallisation bringen (Lipocyankristalle). Der Farbstoff wird zunächst gereinigt, indem man den weingeistigen Auszug mit 30proz. Natronlauge einige Zeit bis zum Kochen erhitzt. Das Fett wird dadurch verseift, der frei gemachte Farbstoff wird von Petroläther aufgenommen. Einige Tropfen des Petroläther-Auszuges werden auf dem Objektträger verdunstet, das Deckglas aufgelegt und eine möglichst geringe Quantität Schwefelsäure zugesetzt. Es entstehen „Schüppchen, Splitter oder eckige Körner", die sich übrigens nur einige Stunden halten. Direkt aus den Präparaten soll

[1]) A. Rosoll, Sitzgsber. Wiener Akad., 1884, LXXXIX, S. 137.

[2]) W. Zopf, Über das mikroskopische Verhalten von Fettfarbstoffen und fettfarbstoffhaltigen Organen, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1889, XI, S. 172.

man Kristalle erhalten können, wenn man den Schnitt austrocknen läßt und dann mit wenig konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Bei Blütenblättern wird die Reaktion sehr durch Zufälligkeit beeinflußt.

Bei der mikrochemischen Bestimmung eines gelbroten Fettfarbstoffes werden in erster Linie die beim Nachweis der Xanthocarotine (s. d.) angeführten Methoden auszuführen sein; vorzüglich wird die Kalimethode, bei der die anwesenden Fette gleichzeitig verseift werden, Aufklärung bringen.

Luteofilin

Luteofilin nennt Molisch[1]) einen in den Schleimsäften verschiedener Amaryllideen, Liliaceen, Gramineen, Commelinaceen, Lobeliaceen auftretenden Körper, dessen Chemismus noch nicht näher erforscht ist. Beim Eintrocknen der isolierten Schleimtröpfchen (Clivia nobilis) scheidet sich Luteofilin in Sphärokristallen aus, die zwar wasserlöslich, aber unlöslich in Weingeist, Äther u. a. sind. Durch 20proz. wässerige Kalilauge werden die Kristalle in verschiedene Kristallformen übergeführt (körnige Bildungen, haarartiger Filz), die im durchfallenden Lichte gelb, im auffallenden blau erscheinen.

Kristalle von Pirola uniflora

Fischer und Linser[2]) erhielten, als sie den Ätherextrakt von Pirola uniflora bei 110° sublimierten, eine große Menge gelber gekrümmter, sehr stark gefiederter Nadeln. Sie halten sie für identisch mit den von G. Fürth[3]) an derselben Pflanze beobachteten. Fürth erhielt Kristalle, als er einen Schnitt durch ein frisches Blatt von P. rotundifolia in destilliertes Wasser legte. Die gelb bis schwarz gefärbten spießförmigen Kristalle bilden am Rand des Blattgewebes einen Kranz von abstehenden Nadeln. Meist sind sie zu rutenförmigen Büscheln vereinigt; sie treten auch einzeln und als verzweigte Spieße auf.

Dieselben Kristalle entstehen auch in durch Äther- oder Chloroformdämpfe abgetöteten Blättern. Auch durch Sublimation entstehen sie als dichter goldglänzender Beschlag von großen fadenförmigen reich verzweigten Kristallen. Bei weiterer Sublimation von Herbarmaterial entstehen dann noch der Reihe nach 1. farblose bis hellgelbe

[1]) H. Molisch, Studien über den Milchsaft und Schleimsaft der Pflanzen, Jena 1901.

[2]) R. Fischer u. E. Linser, Der mikrochemische Nachweis geringer Mengen von Arbutin und Urson in Pflanzen, Arch. d. Pharmaz., 1930, CCLXVIII, S. 185.

[3]) P. Fürth, Sitzgsber. Kais. Akad. Wissensch. Wien, Math. naturw. Kl., Abt. I, 1920, CXXIX, S. 559.

rhombische Blättchen, zum Teil mit einspringenden Winkeln, die durch Verwachsung mehrerer Kristalle entstehen; 2. leuchtend grün gefärbte, flache rhombische Prismen, die meist kettenartig aneinander gehängt sind. Alle diese Stoffe sind miteinander identisch.

Sie sind unlöslich in Wasser, leicht löslich in den üblichen organischen Lösungsmitteln, auch in Petroläther, Benzin und Xylol.

Die aus den verschiedenen Teilen der Blüte auskristallisierenden Kristalle unterscheiden sich von denen aus Blättern und Stielen dadurch, daß sie dunkler gefärbt und kürzer und breiter geformt sind.

Die Kristalle aus grünen Teilen der Pflanze verschwinden in Wasser nach mehreren Tagen für immer; die Kristalle aus den Blütenteilen verschwinden vorübergehend, erscheinen jedoch nach kurzer Zeit wieder als grünliche, spießförmige, zu großen kugeligen Aggregaten vereinigte Kristalle.

Primin

Ein Hautentzündungen hervorrufender Stoff der Primeln, besonders Primula obconica Hance (Bloch u. Karrer), Vierteljahrschr. Naturforsch. Ges. Zürich, 1927, LXII, Beiblatt Nr. 13).

Gelbe Nädelchen (aus Äther oder Petroläther) vorsichtig sublimiert schiefe Rhomben F. 62—63°. Unlöslich in Wasser, sehr leicht löslich in Äther, Chloroform, Weingeist, ziemlich schwer in kaltem Petroläther, besser in warmem. Entfärbt in Eisessiglösung Kaliumpermanganat augenblicklich; reduziert ammoniakalische Silberlösung. Mit konz. Schwefelsäure erst grün, dann blau.

Kobert[1]) fand, daß im Sekret von Primula obconica und Pr. sinensis Kristalle auftreten (ein Befund, den de Bary[2]) bereits erwähnt), die sich leicht in Alkohol, Chloroform, Terpentinöl und Äther lösen und in Wasser unlöslich sind. Am eingehendsten hat sich Nestler[3]) mit den Kristallen beschäftigt. Bei Zusatz von Salzsäure tritt bei Pr. obconica Vermehrung der Kristalle ein, die dann zu Garben und Büscheln zusammentreten. Sie lösen sich ferner in Schwefelsäure, Salzsäure und in Kalilauge und zwar in 10proz. und 25proz. dunkelgrün, in 50proz. dunkelgrün, schnell braun werdend. Aus der Ätherlösung scheiden sich rhombische Prismen und Nadeln aus. Die kristallinische Substanz läßt sich in reinem Zustande gewinnen, wenn man ein Blatt von Pr. obconica mit Äther flüchtig übergießt, den Äther verdunsten läßt und den Rückstand (300 μ lange Kristalle) in Uhrgläsern sublimiert (Sublimationstemperatur 110—115°). Sekret und Kristalle von Pr. ob-

[1]) R. Kobert, Über Giftprimeln, Münch. med. Wochenschr., 1900, S. 1644.

[2]) A. de Bary, Vgl. Anatomie, 1877, S. 106.

[3]) A. Nestler, Die hautreizende Wirkung von Primula obconica und Pr. sinensis, Ber. deutsch. bot. Ges., 1900, XVIII, S. 189 u. 327, ferner: Hautreizende Primeln, Berlin 1904, Gebr. Borntraeger und: Die hautreizende Wirkung der Primula mollis Hook. und Pr. Arendsii Pax, Ber. deutsch. bot. Ges., 1908, XXVI, S. 468.

conica und Arendsii werden von konzentrierter Schwefelsäure langsam dunkelgrün gelöst, aus der Lösung scheiden sich tiefblaue Kristalle und Sphärokristalle ab. Cortusa Matthioli L. ist ebenfalls stark giftig, wie Nestler[1]) experimentell erwies. Auch hier tritt der Giftstoff im Sekret der (langgestielten) Köpfchendrüsen auf. In dem eingetrockneten fettartigen Sekrete finden sich farblose Kristalle, die zuweilen auf andere Teile der Blattepidermis verschleppt werden. Die Kristalle lösen sich in Alkohol und Äther (ohne beim Verdunsten der Lösung kristallinische Rückstände zu geben), in verdünnten Säuren, nicht in Wasser.

Klein und Tröthandl[2]) untersuchten die Verteilung des Giftes, das, wie schon Nestler festgestellt hatte, ein Bestandteil des Sekretes der Drüsenhaare ist, mit Hilfe der Mikrosublimation. Die zerschnittenen frischen Pflanzenteile (¼—½ Blattspreite eines jungen Blattes, ein Blütenschaft oder Blattstiel, 1—2 Blütenkelche und 1—2 Blütenstielchen) wurden in kleinen Glasschälchen im Mikro-Vakuumsublimationsapparat bei ca. 12 mm bei 110—120° ½ Stunde sublimiert. Bei positivem Ausfall erhält man grünlichgelbe Kristalle, die im Mikro-Schmelzpunktapparat zwischen 60° und 62° schmelzen und die Blaufärbung mit Schwefelsäure geben.

Von Primin verschieden ist ein von denselben Autoren aus Cortusa Matthioli dargestellter, ebenfalls sublimierbarer Stoff (s. oben). Es sind farblose schollenförmige oder oktaëdrische Kristalle (F. im Mikro-Schmelzpunktapparat 92—94°), schwer löslich in Wasser, löslich in Weingeist. Mit Schwefelsäure olivgrün, dann braun.

Spergulin

Die chemische Natur des von Harz[3]) angegebenen Spergulins ist ganz unaufgeklärt. Die stickstofffreie Substanz soll leicht in Weingeist und Methanol löslich sein; sie soll sich aber nicht lösen in kaltem und heißem Wasser, verd. anorganischen Säuren, Schwefelkohlenstoff, Chloroform, fetten Ölen u. dgl. In kristallinischer Form ist der fluoreszierende Lösungen gebende Körper noch nicht erhalten. Von konz. Schwefelsäure wird er mit dunkelblauer Farbe gelöst. Spergulin soll in den Samenschalen von Spergula maxima und Spergula vulgaris vorkommen.

Konzentrierte Schwefelsäure färbt in den Präparaten die äußeren stark verdickten Zellwände der Samenschalen tiefblau. Spergulin soll demnach in den Membranen enthalten sein. — Die Sublimation müßte versucht werden.

[1]) A. Nestler, Cortusa Matthioli L, eine stark hautreizende Pflanze, Ber. deutsch. bot. Ges., 1912, XXX, S. 330.

[2]) G. Klein u. O. Tröthandl, Nachweis, Verteilung und Verbreitung des Primelgiftes in der Pflanze, Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1929, XVII, S. 211.

[3]) C. O. Harz, Über die Entstehung und Eigenschaften des Spergulins, eines neuen Fluoreszenten, Bot. Ztg., 1877, XXXV, S. 489.

Chromogene

Mit den Farbstoffen stehen in engem Zusammenhang die Chromogene, die durch Oxydation in Farbstoffe übergehend, nach Palladin im Dienst der Atmung stehen. Viele von ihnen sind offenbar Phenole oder besitzen Phenolgruppen.

Synergin ist ein offenbar glykosidisches, in den Weizenkeimlingen vorkommendes Prochromogen, das mit Emulsin ein durch Peroxydase oxydierbares Chromogen liefert. (W. Palladin, Biochem. Zeitschr., 1910, XXVII, S. 442.)

Ein sehr verbreitetes Chromogen, das Wolff und Rouchelmann studiert haben, bewirkt, daß ein Gemisch von Kaliumjodid, Stärkekleister, Essigsäure und Lakkase (Glyzerinauszug aus Russula delica) gebläut wird. Außerdem hat es folgende Eigenschaften: Unter dem Einfluß von Lakkase oder den Karbonaten der Alkalien oder Erdalkalien gibt es Braunfärbung, ferner fluoreszierende Stoffe, wenn man erst mit Schwefelsäure und Resorzin erhitzt und dann alkalisch macht.

Kleine Mengen von (Querci-)Tannin verhindern die Lakkase-Jod-Reaktion.

(J. Wolff et N. Rouchelmann, Phénomènes d'oxydation et de réduction portant sur les chromogènes des végetaux, Compt. rend. Acad. sciences 1915, CLX, S. 716; dieselben, Sur les propriétés d'un chromogène universellement répandu dans les végetaux, ebenda, 1915, LCXI, S. 399).

Über ein bei den Kakteen vorkommendes, einen roten Farbstoff lieferndes Chromogen hat H. Molisch berichtet (Ber. deutsch. bot. Ges., 1918, XLVI, S. 205).

Serratula tinctoria L.[1]) enthält ein wasserlösliches Chromogen (Serratulan), das unter dem Einfluß von Alkalien, Alaun und anderen Stoffen in einen gelben Farbstoff (Serratulin) übergeht.

10proz. Sodalösung und Kalilauge erzeugen in den das Chromogen enthaltenden Zellen eine Gelbfärbung, Barytwasser einen bräunlichgelben Niederschlag, Ferrisulfat oder Ferrichlorid einen körnigen bräunlichschwarzen Niederschlag. Durch eine 10proz. Lösung von Kalialaun oder Bleiazetat entstehen gelbe Tröpfchen, die zu größeren intensiv gelb gefärbten Tropfen oder Massen zusammenfließen können.

Im Blatt — hier besonders reichlich — findet sich das Serratulan im Zellinhalt der Epidermis- und Mesophyllzellen, im Stengel in erster Linie in der Epidermis, weiter im Kollenchym, Rinden- und Mark-

[1]) H. Molisch, Über das Serratulin, Ber. deutsch. bot. Ges., 1916, XXXIV, S. 554.

parenchym, in der Wurzel im zentralen Gefäßbündel und einer 2—3 Zellen breiten Parenchymzone knapp unter der Epidermis.

Auch andere Kompositen (Dahlia variabilis, Aster sp., Rudbeckia laciniata, Galinsoga parviflora und Hieracium umbellatum) verhalten sich gegenüber Alkalien ähnlich wie Serratula tinctoria, ohne daß es feststeht, ob es sich um denselben Stoff handelt.

Zur Ermittlung der Lokalisation des Chromogens von Vicia Faba werden Schnitte auf zirka 2 Minuten in 0,1 proz. Wasserstoffperoxydlösung gebracht und nach dem Abspülen mit Wasser unter dem Mikroskop beobachtet. Bei bejahendem Ausfall ist Bräunung eingetreten.

(A. G. Wilhelm, Untersuchungen über das Chromogen in Vicia Faba, Jahrbücher f. wissensch. Bot., 1930, LXXII, S. 203; auch W. Pfeffer, Abhandlungen d. math.-phys. Kl. d. Kgl. Sächs. Ges. d. Wiss., 1889, XV, S. 375.)

Flechtenstoffe

In den Flechten kommt eine große Anzahl eigentümlicher Stoffe vor, die teilweise in systematischer Hinsicht von Bedeutung sind.

Schon E. Bachmann[1]) hat mikrochemische Reaktionen zur Bestimmung von Krustenflechten angewandt. Er untersuchte die schwarzen Apothezien, deren Pigment aus verschiedenen Farben zusammengesetzt ist, mit Kalilauge, Ammoniak, Salpetersäure und Salzsäure.

Viele Beispiele für die Verwendung der Flechtenstoffe in der Systematik der Flechten findet man in W. Zopfs grundlegendem Buch: Die Flechtenstoffe (Jena 1907, Gustav Fischer). Z. B. führen sämtliche Thelochisteen Parietin und werden daher durch Kalilauge rot, im Gegensatz zu den Caudelariaceen, die statt dessen Stictaurin führen und durch Kalilauge nicht rot werden.

Viele dieser Flechtenstoffe sind farbig und bestimmen oder beeinflussen die Färbung der Thalli und der Apothezien. Häufig ist die Zellwand der Sitz des Farbstoffes. In anderen Fällen ist der Farbstoff fettartig oder an Fetttropfen gebunden.

Über die Vorkommen der einzelnen hier beschriebenen Flechtenstoffe siehe insbesondere das Buch von Zopf.

Flechtensäuren

Als Flechtensäuren faßt man eine Anzahl Flechtenstoffe saurer Natur zusammen, welche meist den Hyphen oder der Thallusoberfläche aufgelagert sind, vornehmlich den im Wachstum begriffenen Thalluslappen und den Bildungsstätten

[1]) E. Bachmann, Mikrochemische Reaktionen auf Flechtenstoffe als Hilfsmittel zum Bestimmen der Flechten, Zeitschr. wiss. Mikroskopie, 1886, III, S. 216.

der Soredien. Sie verleihen den Flechten vielfach ganz charakteristische Färbungen. Ihre biologische Bedeutung ist unbekannt.

Senft[1]) bedient sich der Fähigkeit der Flechtensäuren, aus heißem Öle (Knochenöl) in für die Diagnose charakteristischen Kristallen auszukristallisieren. Man zerreibt ein kleines Thallusstückchen (am besten des Randes) in einem Tropfen Öl und erhitzt über kleiner Flamme einige Zeit. Nach einem Tage tritt Kristallbildung ein. Ist die vorhandene Menge an Flechtensäure nur gering, so ist es ratsam, zunächst den Flechten die Säuren durch Auskochen mit Chloroform, Alkohol oder Benzol zu entziehen. Der Auszug wird eingedunstet, der Rückstand in heißem Öl zur Kristallisation gebracht (Ölverfahren). Sowohl Derivate der Pulvinsäure als auch der Azetylessigsäure lassen sich mit heißem Öl nachweisen.

Die Säuren der Roccella-, Lecanora- und Ochrolechia-Arten (Lecanor-, Erythrin- und Atranorsäure), welche Orcin abspalten, wies Ronceray[2]) mit Hilfe von Vanillinschwefelsäure nach (0,25 g Vanillin, je 2 Vol. Wasser und konzentrierte Schwefelsäure). Es tritt eine violett-rote Färbung ein. Der Orcinnachweis wird sich jedenfalls auch durch unmittelbare Sublimation erbringen lassen. Weitere Reaktionen geben Ferrichlorid (violettrote Färbung) und Chlorkalklösung (rote Färbung).

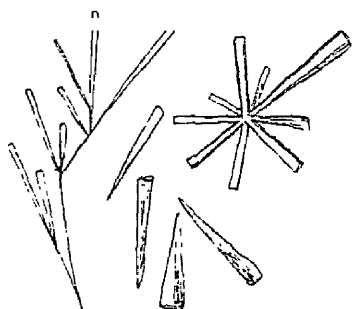



Fig. 95. Rhizocarpsäure aus Rhizocarpon geographicum mit dem Ölverfahren erhalten (Tunmann)

Bei Berücksichtigung der Kristallformen ist es nach Senft möglich, mehrere Flechtensäuren einer Flechte nebeneinander nachzuweisen. Die Präparate können nach Verschluß als Dauerpräparate aufbewahrt werden.

Über die Verfahren zur Bestimmung der Lokalisation der Flechtensäuren berichtet Zopf ausführlich in seinem Buche über Flechtenstoffe, dem die folgenden Angaben entnommen sind. Als Reagentien werden benutzt Alkalien, alkalische Erden, Hypochlorite, Schwefelsäure und Salpetersäure.

I. Mit Baryt- oder Kalkwasser (gesättigte filtrierte Lösungen) entstehen gefärbte schwer- oder unlösliche Verbindungen.

Gelb: Atranorin, Evernsäure, Ramalsäure, Thamnolsäure, Hirtellasäure, Alectorialsäure, Leprarin.

---

[1]) Em. Senft, Ein neues Verfahren zum mikrochemischen Nachweis der Flechtensäuren, Pharm. Praxis, 1907, VI, Nr. 12.

[2]) Ronceray, Contribution a l'étude des Lichens á Orseille, Thèse, Paris 1901, S. 50.

Rost- bis blutrot: Usnarsäure, Salazinsäure, Scopulorsäure, Kullensissäure.

Purpurviolett bis violett: die Anthrazenderivate Parietin, Solorinsäure, Nephromin, Fragilin, Rhodophyscin, Orygmaeasäure, Endococcin, Blasteniasäure.

Blau: Patellarsäure, Diploschistessäure, Blau(span-)grün: Olivetorsäure.

II. Baryumperoxyd (warme, gesättigte wässerige Lösung): Olivetorsäure intensiv zitronengelb, allmählich spangrün.

III. Chlorkalk (2 Chlorkalk, 1 Wasser).

Blutrot, karmoisinrot oder rotviolett: Lecanorsäure, Erythrinsäure, Erythrin, Olivetorsäure, Gyrophorsäure, Alectorialsäure, Glabratsäure, Betaerythrin, Porinsäure, Olivaceasäure, Olivacein, Stictinin.

Grün: Pulverarsäure, Strepsilin, Porphyrilsäure. Erst rot, dann blau: Diploschistessäure, Patellarsäure.

IV. Kalilauge (50proz. oder 30proz.). Die Färbungen sind ungefähr dieselben, wie die mit der Gruppe I.

V. Bei manchen Flechten tritt eine charakteristische Färbung mit Chlorkalk erst nach Vorbehandlung mit Kalilauge ein, weil durch diese zunächst eine Spaltung erfolgen muß.

Rot: Parmelia glomellifera Nyl. Violett: Pertusaria faginea.

VI. Konzentrierte Schwefelsäure. Anfangs intensiv gelb, dann rot: Salazinsäure, Usnarsäure, Scopulorsäure.

Lichesterinsäure[1])

Bestandteil des isländischen Mooses (von Cetraria islandica). Perlmutterglänzende farblose quadratische oder rhombische Platten. F. 124,5—125,5°. Unlöslich in Wasser, leichtlöslich in Weingeist, heißem Eisessig und Benzol, in Schwefelkohlenstoff und Chloroform; weniger löslich in Petroläther, Azeton und heißem verdünntem Weingeist. Sublimierbar.

Unterwirft man den Thallus von Cetraria islandica (einige feine Schnipsel) der Sublimation, so erhält man die Lichesterinsäure teils als kleine Plättchen, die entweder einzeln liegen oder zu mehreren verwachsen, teils als undeutlich prismatische Bildungen (Fig. 96). Die Kristalle polarisieren lebhaft, werden im Mittel 15—35 μ groß und zeigen gerade Auslöschung. Löst man sie in einem Tropfen starken Ammoniaks, so kristallisiert bald das Ammoniumsalz aus. Zuerst entstehen kurze, gerade und einzeln liegende Kristalle, rhombische Prismen und ganz vereinzelt rhombische Plättchen. Zuweilen wachsen die Plättchen an einem Ende zu Prismen aus. Nach 5—10 Minuten

[1]) O. Tunmann, Der Nachweis der Lichesterinsäure, Apoth.-Ztg., 1913, XXVIII, S. 892.

verwachsen die Prismen zu bis millimeterlangen, gebogenen, feinen Kristallähren oder stärkeren „bastfaserartigen" Gebilden heran (Fig. 96 d rechts). Zum Umkristallisieren eignet sich Weingeist.

Auch die Natrium- und Kaliumsalze können zur mikrochemischen Diagnose herangezogen werden. Bedeckt man das Sublimat mit einem flachen Tropfen 10 proz. Sodalösung, dann beginnt schon nach wenigen Minuten die Ausscheidung des Natriumsalzes. (Hat man zuviel Sodalösung genommen, dann erwärme man vorsichtig und bringe das Prä-

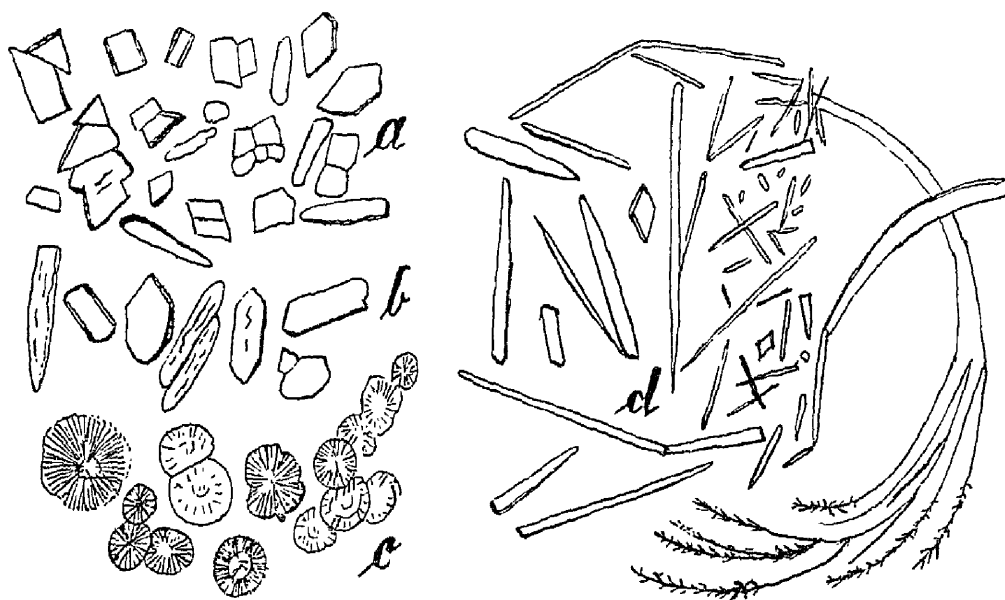



Fig. 96. *a*) Lichesterinsäure durch Sublimation unmittelbar aus dem Thallus erhalten. *b*) Aus kleinkörnigen Sublimaten durch Umkristallisieren mit Weingeist erhaltene Kristalle. *c*) Aus den Sublimaten mit Natriumkarbonat erhaltenes Natriumsalz der Lichesterinsäure. *d*) Mit konzentriertem Ammoniak entstandenes Ammoniumsalz (Tunmann)

parat auf einige Zeit in den Exsikkator.) Das Natriumsalz der Lichesterinsäure scheidet sich stets in Sphärokristallen ab, die nicht immer völlig rund sind und meist in kleinen Gruppen oder in Reihen erscheinen (Fig. 96 c). Sie messen im Mittel 10—20 μ und zeigen lebhafte Polarisationsfarben.

Man kann die Lichesterinsäure auch direkt in der Flechte nachweisen, wenn man mehrere Schnitte in Ammoniak einlegt. Man erhält nach dem Eintrocknen außerhalb der Schnitte mehrere Kristalle des Ammoniumsalzes.

Pulvinsäure-Derivate

Vulpinsäure

Monokline Kristalle. F. bei 148°. Kristallisiert aus Äther oder Weingeist in Prismen, aus Benzol oder Chloroform in dicken Platten; beide Formen sind zitronengelb. Unlöslich in Wasser, schwer in Weingeist und Äther, leichter in Benzol, gut in Chloroform und Schwefelkohlenstoff.

Mit dem Ölverfahren wurde Vulpinsäure nachgewiesen in Cyphelium chrysocephalum, Evernia vulpina, Cetraria pinastri.

Molisch gewann sie durch Mikrosublimation aus Evernia vulpina.

Pinastrinsäure

Aus Weingeist und Äther goldgelbe bis orangerote Prismen und schmale Platten; aus Chloroform rhombische pleochroitische (rotbraun-gelbe) Kristalle. F. 200—203° (196—198°). Schwer löslich in kaltem Weingeist und Äther, leicht in kaltem Chloroform und Benzol. In Ätzalkalien, Karbonaten und Bikarbonaten der Alkalien mit gelber Farbe löslich, ebenso in konzentrierter Schwefelsäure.

Mit dem Ölverfahren erhält man bei Lepraria flava, Cetraria pinastri, Lepraria flava quercina goldgelbe, zu Büscheln, Garben oder Rosetten vereinigte Nadeln (Unterschied von Calycin). Sublimation ergibt 1 μ breite, 20—100 μ lange gerade oder gebogene, gelbe Nadeln.

Rhizocarpsäure

Aus Weingeist zitronengelbe glänzende monokline Prismen. F. 177—179°. Schwer löslich in kaltem Weingeist und Äther, leicht in den siedenden Flüssigkeiten, sowie in Chloroform und Schwefelkohlenstoff.

Beim Ölverfahren (geprüft an Calycium hyperellum, Acolium tigillare, Rhizocarpon geographicum (Fig. 95), R. viridiatrum, Pleopsidium chlorophanum) entstehen ganz verschiedene Kristallformen. Prismen in Rosetten, büschel- und fächerförmige Kristalle, strauchförmige Gebilde, derbe harmonikaartig zusammengedrückte Gebilde. Die Kristallform ist von der Menge der Säure abhängig. Die Rhizocarpsäure kann aus dem Gewebe auch durch Sublimation nachgewiesen werden. Das Sublimat besteht aus sechsseitigen Täfelchen.

Calycin

Kommt in Lepraria-Arten und Chrysothrix Nolitangere Mont. vor, wo die den Hyphen aufgelagerten Körnchen und Schollen aus Calycin bestehen (Senft).

Aus Weingeist feine Nadeln, aus Benzol, Chloroform oder Eisessig schmale ziegel- bis chromrote rhombische Prismen. F. etwa 242°. Am besten löslich in warmem Chloroform oder Benzol. In Kalilauge ohne Farbenveränderung allmählich löslich (Senft).

Das Ölverfahren liefert dünne, beiderseits zugespitzte, bisweilen etwas gebogene, gelbe, meist einzeln liegende, seltener lockere rosettenbildende Nadeln, die Sublimation derbe, orangegelbe Nadeln.

Um größere Kristalle darzustellen, ging Senft[1]) folgendermaßen vor: „Ein kleines Pröbchen des zerzupften Thallus wurde mit Eis-

[1]) E. Senft, Beiträge zur Anatomie und zum Chemismus der Flechte Chrysothrix Nolitangere Mont., Ber. deutsch. bot. Ges., 1916, XXXIV, S. 592.

essig betupft, darauf das Präparat mit dem Deckgläschen zugedeckt und an einer Seite mit einem dünnen Papierstreifen unterlegt. Nun wurde von der Seite so viel Eisessig zufließen gelassen, bis der Raum zwischen beiden Gläschen vollkommen ausgefüllt war. Daraufhin wurde das Präparat bis zum Sieden erwärmt und die Essigsäure zum Verdunsten gebracht.“ Es traten nadel- und plättchenförmige, orangerot gefärbte Kriställchen auf.

Versetzt man ein Stäubchen des Flechtenthallus mit einem Tröpfchen 10proz. Sodalösung, so verblaßt die Probe allmählich und wird beim Erwärmen fast farblos. Durch Zusatz einer Spur Salzsäure kehrt die Farbe wieder. Läßt man dann zu dem eingetrockneten Präparat Äther zufließen, so färbt sich der Äther stark gelb und hinterläßt beim Eindunsten Calycinkristalle.

Die physiologische Bedeutung des Calycins sieht Senft im Schutz gegen zu starke Transpiration und schädliche Lichtstrahlen.

Stictaurin

Aus heißem Äther bei schnellem Erkalten feine Prismen und Täfelchen, bei langsameren Auskristallisieren aus Äther goldglänzende, orangerote bis hellrotbraune dünne Täfelchen. F. 211—212°.

Unlöslich in Wasser und kalten Alkalien, in heißen Ätzalkalien unter Zersetzung löslich. Schwer löslich in absolutem Alkohol, Äther und Eisessig, leicht in Chloroform, Benzol und Schwefelkohlenstoff.

Das Ölverfahren ergibt (bei Sticta-Arten) orangefarbene Nadeln, spindelförmige Gebilde mit rauher Oberfläche, sowie kugelige Körper.

Acetessigsäure-Derivate

Usninsäure

Kommt in Parmeliales und Lecideales vor.

Aus Benzol und Chloroform bei langsamem Auskristallisieren breite, relativ dicke zitronengelbe Platten des rhombischen Systems, aus verdünntem Weingeist sehr dünne elliptische Blättchen, aus Äther schmale Prismen. F. der optischaktiven Form bei schnellem Erhitzen 200—203°, der inaktiven Form 191—192°.

Unlöslich in Wasser und selbst in heißem Weingeist sehr schwer löslich, gut löslich in heißem Eisessig und Benzol, am besten in heißem Chloroform. Aus heißem Öl erhielt man aus Usnea-, Ramalina- und Platysma-Arten säulenförmige, zuweilen an einem Ende rechtwinklig abgestutzte Kristalle.

Isocyklische Flechtensäuren

Psoromsäure-Gruppe

Salazinsäure

Bei langsamen Auskristallisieren aus Azeton feine kurze Nädelchen. Schmilzt unter Zersetzung. Schmeckt bitter. Unlöslich in kaltem Wasser, zersetzt sich in

heißem. Am besten in Azeton löslich. Die azetonische Lösung wird durch Spuren von Ferrichlorid weinrot. Die intensiv gelbe Lösung in verdünnter Kalilauge wird schnell rotgelb, dann rotbraun.

Zum Nachweis der Salazinsäure geht Lettau[1]) in folgender Weise vor: Man stellt sich zunächst ein Quetschpräparat her. Eine nicht allzu kleine Menge der Pflanze — möglichst einige Kubikmillimeter — wird auf dem Objektträger in einen Tropfen destillierten Wassers eingelegt und zunächst mit zwei Nadeln noch weiter zerkleinert. Dann wird ein zweiter Objektträger quer über den ersten gelegt und durch Druck von beiden Seiten und Gegeneinanderreiben die Flechtenmasse zerquetscht und fein zerteilt. Dann werden die Objektträger voneinander getrennt; die zerriebene Masse wird unter Hinzufügen eines weiteren kleinen Tropfens Wasser auf dem einen gesammelt und das Deckglas so aufgelegt, daß der gesamte Raum unter ihm gerade von der Flüssigkeit ausgefüllt ist. Man setzt dann einen Tropfen Alkali — am besten gesättigte (22—26proz.) Sodalösung — hinzu. Hat sich das Alkali durch den größeren Teil der Flüssigkeit verbreitet, so setzt man von der dem Alkalizusatz entgegengesetzten Seite einen Tropfen Glyzerin hinzu. Man beobachtet nach 20—30 Stunden. Man findet dann das Natriumsalz der Salazinsäure oder der daraus entstehenden Salazinin-(Rubiadin-)Säure als rote nadelförmige Kristalle in Einzelnadeln, Sternen und Büscheln.

Zum Nachweis der Lokalisation ist Barytwasser besser geeignet, das mit Salazinsäure amorphe rote bis rostbräunliche Färbungen gibt. Der Sitz der Salazinsäure ist im Flechtenlager ein recht verschiedener: Manchmal die Rinde, manchmal das Mark und dann gewöhnlich in der Hauptsache die oberen Teile desselben, die der Gonidienschicht nahe liegen, manchmal auch das Hymenium (Epithezium) der Früchte; häufig kommt sie in mehreren Schichten des Lagers zugleich vor (Lettau).

Atranorin-Gruppe

Atranorinsäure

F. 102—103°.

Durch Mikrosublimation aus Parmelia physodes L., P. furfuracea L. Zopf, P. sulcata Tayl. und P. saxatilis L. erhielten Heyl und Kneip[2]) Atranorinsäure, entstanden aus primär vorhandenem Atranorin. Bei langsamem Erhitzen erhält man stumpfe Nadeln und Plättchen, bei schnellem Kristalle verschiedener Art. Die Kristalle leuchten zwischen gekreuzten Nikols in allen Farben.

---

[1]) G. Lettau, Nachweis und Verhalten einiger Flechtensäuren, Hedwigia, 1914, LV, S. 1.

[2]) G. Heyl u. P. Kneip, II. Mitteilg. betr. Parmelia-Arten, Apothek.-Ztg., 1914, XXIX, S. 564.

Die Kristalle sind unlöslich in kaltem Wasser, löslich in heißem sowie in Weingeist u. dgl. Die Lösung in verdünntem Ammoniak scheidet beim Verdunsten lange dünne Nadeln aus; Sublimation dieses Rückstandes ergibt feine Nädelchen. In Ätzalkalilaugen und den Lösungen der Karbonate lösen sich die Sublimate mit gelber Farbe; auch in Baryt- und Kalkwasser sind sie löslich. Säuren bewirken in allen diesen Lösungen kristallinische Ausscheidungen. Durch Betupfen mit Chlorkalklösung färbt sich das Sublimat gelbbräunlich; die Färbung verblaßt allmählich. Konzentrierte Schwefelsäure löst das Sublimat mit gelblicher Färbung, Ferrichlorid färbt dessen weingeistige Lösung blaugrün. Man führt die Reaktion am besten so aus, daß man auf das Sublimat sehr wenig Ferrichlorid bringt und unter Betrachten mit dem Mikroskop einen Tropfen Weingeist zufließen läßt.

Anthracen-Derivate

Rhodocladonsäure

Von Zopf 1907, von Senft[1]) 1914 in zahlreichen Cladonien nachgewiesen.

Breitkeilförmige Platten. Aus Eisessig fuchsrote, zumeist an einem Ende schief abgestutzte, am anderen Ende etwas verjüngte Nadeln, vereinzelt oder in Gruppen. Auslöschungsrichtung parallel und senkrecht zur Längsrichtung der Platten. Nicht unzersetzt sublimierbar. Schwer löslich in den üblichen neutralen Lösungsmitteln.

Die rotbraune Lösung in Soda oder Natriumbikarbonat wird durch Permanganat unter Ausscheidung eines rötlichen Niederschlags entfärbt.

In konzentrierter Schwefelsäure mit intensiv purpurroter Farbe löslich, die vom Rand zu der Mitte des Deckgläschens aus in Gelb übergeht. Nach etwa 10 Minuten wird (infolge der Anziehung von Wasser) die Rhodocladonsäure anscheinend unverändert wieder ausgefällt. Die Form der fuchsroten Kristalle ist charakteristisch. Es sind, in der Fläche gesehen, überaus dünne, an beiden Enden abgerundete Plättchen, manchmal auch von ovaler oder elliptischer, ja ganz kreisrunder Gestalt, welche auf der Kante aufgestellt, sich als dünne Nadeln repräsentieren. Daneben findet man auch dolchförmig zugespitzte Nadeln. Die Kriställchen kommen zumeist in dichten Rosetten geformt vor, wobei die dünnen Kriställchen, obschon Plättchen oder Nadeln, mehr oder weniger gebogen sind.

Der eigentliche Sitz der Säure ist in den Köpfchen, dem Epithezium und Hypothezium; Senft fand außerdem, daß auch die zin-

[1]) E. Senft, Beiträge zur Mikrochemie einiger Anthrachinone, Zeitschr. allgem. österr. Apoth.-Ver., 1914, LII, S. 181.

noberrote Farbe der Unterseite der Thallusläppchen durch die Rhodocladonsäure verursacht wird.

Blastenin

Von Hesse 1899 in Blastenia-Arten entdeckt.

Aus Eisessig orangerote Kristallaggregate aus kurzen sechsseitigen, an dem einen Ende durch ein Pinakoid abgestumpften Prismen. Mit orangeroter Farbe leicht in Weingeist löslich, sehr leicht in Äther, Azeton und Chloroform.

Schmilzt bei 270° und sublimiert bei weiterem Erhitzen in gelben Dämpfen, die sich in kleinen gelben Tröpfchen und winzigkleinen, fast farblosen Kriställchen niederschlagen. Die Tröpfchen färben sich mit Kalilauge karminrot, ohne sich darin zu lösen. Das Sublimat (wie das reine Blastenin) löst sich in konzentrierter Schwefelsäure mit karminroter Farbe, die vom Rande des Deckgläschens aus allmählich in Gelb umschlägt. In wenigen Minuten bilden sich dann winzige farblose oder zitronengelbe Nadeln. Häufig in Garben, Doppelbesen oder Rosetten.

In heißem Paraffinöl kristallisiert Blastenin langsam (gewöhnlich erst nach einem Tag) in gelben bis orangeroten zu Bündeln oder Garben vereinigten nadelförmigen Kriställchen. Aus den zerkleinerten Apothezien läßt sich Blastenin auf dem Objektträger mit Chloroform extrahieren und kristallisiert dann vom Rande in unregelmäßigen Täfelchen und Nadeln aus, die direkt der Sublimation unterworfen werden können. Das Blastenin sitzt bei Blastenia arenaria Mass. und Bl. percrocata Arn. dem Epithezium in Form kleiner gelber Körnchen auf und läßt sich mitunter stellenweise ziemlich tief in das Hymenium hinein verfolgen (Senft)[1].

Solorinsäure[2]

Von Zopf 1895 in Solorina crocea L. aufgefunden.

Rote, vielleicht monokline Kristalle, deren dünne Exemplare Pleochroismus (dunkelbraun bis hellgelb) zeigen. Unlöslich in Wasser, auch in den anderen üblichen Lösungsmitteln nur schwer löslich, am besten in Chloroform und Benzol. Die Lösungen sind rotgelb bis rotbraun.

F. 199—200°. Sublimiert bei weiterem Erhitzen unter Entwicklung von gelben Dämpfen. Das Sublimat — unter dem Mikroskop zunächst fast farblose Körnchen — erscheint auf einer schwarzen Unterlage grüngelb, auf weißer Unterlage schön rötlich. Es wird vom Rande her bald kristallinisch. Die Kristalle stellen gleichmäßig breite, an beiden Enden schief abgestutzte Nadeln dar, von denen die dünneren schwach blaßgelb, die dickeren orangerot gefärbt sind. Sublimierte

[1]) Senft, l. c. S. 420.

[2]) Senft l. c.

und nichtsublimierte Säuren lösen sich in konzentrierter Schwefelsäure mit violetter Farbe, die vom Rande des Deckgläschens her rasch in Gelb übergeht. Dabei kommt es zur Ausscheidung eines flockigen amorphen, gelben Niederschlages, der sich allmählich in sehr dünne orangerote (oder gelbe) zumeist ungemein kurze (manchmal 5—7 μ. lange) Stäbchen umbildet. Sie bilden manchmal größere strahlenförmig angeordnete Fäden.

In 10proz. kalter Kalilauge färben sich die Kriställchen der Solorinsäure anfangs rötlich, dann rot und schließlich violett, ohne sich zu lösen, beim Erwärmen zerfallen die Kriställchen zu einem amorphen violetten Niederschlag.

Zum mikrochemischen Nachweis ist besonders die Sublimation in Kombination mit der Schwefelsäure-Reaktion geeignet.

Der Sitz der Solorinsäure ist bei Solorina crocea das Mark, dessen Hyphen dicht mit kleinen Körnchen der Säure bedeckt sind (Senft).

Rhodophyscin[1])

Von Zopf 1898 in Physcia endococcinea Krb. entdeckt.

Aus Eisessig und bei schnellem Auskristallisieren aus Chloroform mikroskopisch kleine kahnförmige Blättchen, bei langsamem Auskristallisieren aus letzterem bis zu 1 mm lange schmale Prismen.

Aus der Flechte erhält man sie durch Auskochen mit Essigsäure auf dem Objektträger in sehr kleinen orangegelben oder orangeroten zu Bündeln oder kleinen Rosetten vereinigten Kriställchen, die sich auch in amorphe orangerote Schollen umwandeln können. Sie gehen durch mehrfaches langsames Umkristalliseren wieder in die kahnförmige Form über.

Rhodophyscin zersetzt sich beim Erhitzen allmählich ohne zu sublimieren. In konzentrierter Schwefelsäure mit purpurroter Farbe löslich, die bald in Schmutzig-braunviolett und schließlich in Grün umschlägt. Dabei scheidet sich das Rhodophyscin als amorpher, feinkörniger, schmutzig-braungrüner Niederschlag aus. Mit 10proz. Kalilauge entsteht sofort eine himbeerrote Lösung, später ein amorpher, violetter Niederschlag.

Unter dem Mikroskop erscheinen die Markhyphen mit dem Rhodophyscin imprägniert, ihre zinnoberrote Farbe ist dadurch bedingt (Senft).

Physcion (Flechtenchrysophansäure)

Physcion[2]) (Hesse)[3]), Chrysophansäure (Rochleder und Heldt), Parietin (Thomson und Zopf), Physciasäure (Paternó), Chrysophyscin (Lilienthal)

[1]) Senft l. c. S. 420.

[2]) Physcion ist kein Glykosid.

[3]) O. Hesse, Über einige Flechtenstoffe, Liebigs Ann., 1895, CCLXXXIV, S. 177.

ist nach Oesterle und Johann[1]) Emodinmonomethyläther. Schwer löslich in Chloroform, Benzol, Eisessig, noch schwerer in Weingeist. Es ist von Hesse aus heißem Benzol, Alkohol oder Eisessig in glänzenden Blättchen (F. ca. 207°) erhalten worden und das einzige gelbe Produkt der Flechten, welches sich in Kalilauge, Natronlauge und Schwefelsäure mit roter Farbe löst und ebenso wie Calycin und Pinastrinsäure ein gelbes Sublimat liefert. Es kommt überwiegend auf der Oberseite des Thallus vor und ist in und auf der Rindenschicht in Form kleiner Körnchen abgelagert. Die Bildung ist in erster Linie vom Substrat abhängig. Physcion wird als Extrakt gedeutet, als Schutzmittel gegen Bakterien (Stahl[2])) und Tierfraß (Zopf[3]), Bachmann[4])) und ist für verschiedene Arten von Theloschistes (Xanthoria) und Calloplaca angegeben worden.

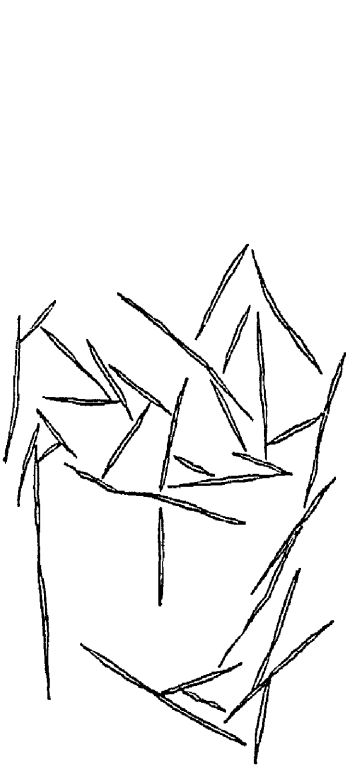



Fig. 97. Sublimat aus Xanthoria parietina (Heyl u. Kneip)

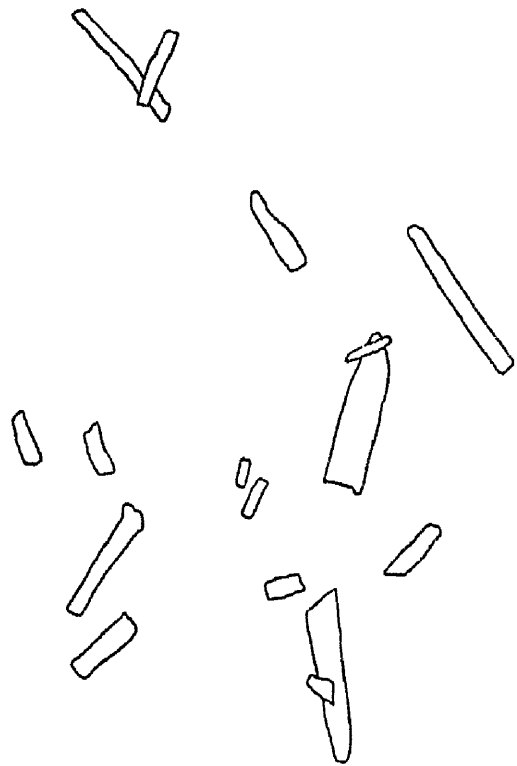



Fig. 98. Sublimat aus Xanthoria parietina (Heyl u. Kneip)

Der mikrochemische Nachweis (Senft)[5]) kann in Präparaten oder im Flechtenpulver nur geführt werden, wenn der Gehalt an Physcion

[1]) O. Oesterle und U. Johann, Über die sog. Methylchrysophansäure, Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 476.

[2]) E. Stahl, Die Schutzmittel der Flechten gegen Tierfraß, Haeckel Festschrift, 1904.

[3]) W. Zopf, Zur biologischen Bedeutung der Flechtensäuren, Biolog. Centralbl., 1896, XIV, S. 594.

[4]) E. Bachmann, Mikrochem. Reakt. auf Flechtenstoffe als Hilfsmittel zum Bestimm. v. Flechten, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1886, III, S. 216 und Flora, 1887, LXXVIII, S. 291.

[5]) Em. Senft, Über das Vorkommen von Physcion in den Flechten und

ein hoher ist. Durch Zusatz von 10 %iger Kalilauge erfolgt Rotfärbung und nachher Ausscheidung eines amorphen Niederschlages[1]). Konzentrierte Schwefelsäure bewirkt eine rote Lösung und nach einiger Zeit bilden sich am Rande des Deckglases 4—14 μ lange, kaum 0,5 μ

Fig. 99. *Sublimat aus frischen Exemplaren der Xanthoria parietina* (Heyl u. Kneip)

breite und an beiden Enden zugespitzte Nadeln. Aus heißer Salpetersäure kristallisiert Physcion in gelben geraden Nadeln, die sich zu Rosetten vereinigen. Kalk- und Barytwasser lassen sich, wie schon

über den mikrochemischen Nachweis desselben, Wiesner Festschrift, 1908, S. 176.

[1]) Reines Physcion gibt mit Kalilauge wetzsteinförmige Blättchen (unbeständig), die nach kurzer Zeit in scharf zugespitzte Nadeln übergehen.

Frank Schwarz[1]) zeigte, ebenfalls benutzen. Doch tritt die rote Färbung erst nach einigen Stunden ein, daher ist es ratsam, das Deckglas mit Vaselin zu umziehen, um die Bildung kohlensaurer Alkalien auszuschließen, welche das Bild undeutlich machen.

Beim Erhitzen einer größeren Menge Flechtenpulver unter Deckglas in Paraffinöl kristallisiert Physcion in feinen gelben Nadeln aus, die in Büschel und Garben gruppiert sind. Ist der Physciongehalt der zu untersuchenden Flechten gering, dann wendet man die Mikrosublimation an (gelber Belag, der anfangs amorph ist und langsam in derbe gelbe Nadeln übergeht). Mit dem erhaltenen Sublimat lassen sich die eben angeführten Reaktionen ausführen. Die dabei entstehenden Niederschläge fallen natürlich in der Kristallform viel schärfer aus.

Ist der Gehalt an Physcion recht gering, dann stellt man zunächst Roh-Physcion durch Extraktion der Flechten mit Äther oder Chloroform her und bringt das Lösungsmittel zur Verdunstung. Man kann seltene Flechten hierbei erhalten, indem man sie in toto auszieht. Mit dem Roh-Physcion, das aus dünnen gelben Blättchen besteht, werden die Reaktionen ausgeführt. —

Heyl und Kneip[2]) haben die zunächst im Exsikkator über Chlorkalzium getrockneten und dann gepulverten Flechten im Tunmannschen Apparate sublimiert. Schnelles Wechseln der Objektträger ist nötig. Bei Verwendung von ganz trockenem Herbarmaterial erhält man neben einfachen zugespitzten Nadeln (Fig. 97), die bei etwas längerer Sublimation ein ganzes Gewirr von Kristallen geben, große, schon mit unbewaffnetem Auge sichtbare glänzende Blättchen (Fig. 98). Bei Verwendung von frischem Material erhält man prachtvolle moosartige Gebilde (Fig. 99); die Kristalle polarisieren deutlich.

Konzentrierte Schwefelsäure löst die Sublimate mit blutroter Farbe; beim Stehenlassen verblaßt die Lösung und die Substanz scheidet sich allmählich in dünnen gelben Kristallen wieder aus, ebenso durch Zusatz von Wasser.

Verdünnte Kali- und Natronlauge lösen die Sublimate leicht mit blutroter Farbe; Säure scheidet das Physcion wieder aus.

Kalk- und Barytwasser färben purpurviolett. Karbonate und Chlorkalklösung verändern die Sublimate nicht.

[1]) Fr. Schwarz, Chem. bot. Studien üb. d. in d. Flechten vorkommenden Flechtensäuren, Cohns Beiträge, 1880, III, S. 249.

[2]) G. Heyl u. P. Kneip, Die Mikrosublimation von Flechtenstoffen, I. Mitteilg. betr. Xanthoria parietina (L.) Th. Fr., Apoth.-Ztg., 1913, XXVIII, S. 982.

In den Markhyphen von Nephroma lusitanica gab Bachmann[1]) Emodin an, welches in Gestalt kleiner Kristallkörnchen der Membran aufgelagert ist. Es soll sich vom Physcion dadurch unterscheiden, daß es in Alkohol, Amylalkohol, Eisessig leicht löslich ist und von konz. Schwefelsäure safrangelb gelöst wird. Doch wird das Vorkommen von Emodin in Nephroma von Hesse verneint.

Alkaloide

Unter Alkaloiden verstehen wir hier stickstoffhaltige organische Pflanzenbasen, bemerken aber, daß ein grundsätzlicher Unterschied zwischen pflanzlichen und tierischen Basen nicht besteht. Die Alkaloide bilden mit Säuren Salze, diese mit Metallsalzen Doppelverbindungen; die Alkaloide zeigen demgemäß ein chemisches Verhalten, das dem des Ammoniaks oder der Ätzalkalien (quaternäre Ammoniumbasen) analog ist. Man kann die Alkaloide in folgende Gruppen einteilen: Aliphatische Basen (Methylamin, Trimethylamin, Agmatin), Aromatische Basen (Tyramin, Damascenin, Ephedrin, Capsaicin), Pyridin- und Piperidinbasen (Trigonellin, Piperin, Areka-, Granat- und Koniumbasen), Pyrrolbasen (N-Methylpyrrolin, Hygrin), Basen mit zwei kondensierten Piperidinringen (Pseudogranatin), Basen, die einen Pyrrol- (Pyrrolidin-) und einen Pyridin (Piperidin-)kern enthalten (Koka- und Solaneenbasen), Glyoxalinbasen (Pilocarpus-Alkaloide), Basen mit kondensiertem Glyoxalin- und Pyrimidinkern (Purinbasen: Koffein, Theobromin, Theophyllin), Isochinolinbasen (Papaverin, Narkotin, Narcein, Ipekakuanha-Alkaloide), Phenanthrenbasen (Morphin und seine Verwandten, Colchicin), Chinolinbasen (die Cinchonaalkaloide), Basen mit kompliziertem mehrkernigem Skelett (Brucin, Strychnin, Physostigmin) Basen mit noch unbekannter Konstitution (die noch größte Gruppe mit den Akonitinen, Sabadill- und Veratrumalkaloiden, Taxin).

Der erste in diese Gruppe gehörige Stoff, das Morphin, wurde zuerst von dem französischen Apotheker Derosne im Anfang des 19. Jahrhunderts isoliert und von dem deutschen Apotheker Sertürner als Base erkannt. Das Wort Alkaloid wurde 1819 von Meißner geprägt. Die erste Synthese eines Alkaloids gelang Ladenburg 1886 mit der Synthese des Coniins.

Alkaloide finden sich in sehr vielen Pflanzenfamilien. Genannt seien: Coniferen, Palmen, Liliaceen, Piperaceen, Ranunculaceen, Berberideen, Menispermaceen, Papaveraceen, Fumariaceen, Papilionaceen, Erythroxylaceen, Zygophyllaceen, Rutaceen, Sterculiaceen, Theaceen, Punicaceen, Umbelliferen, Loganiaceen, Solanaceen, Rubiaceen.

Bezüglich der physiologischen Bedeutung der Alkaloide herrscht die Ansicht vor, daß es sich um Abfallprodukte des Stoffwechsels handle. Man begründet dies damit, daß sie vorzugsweise in physiologisch toten Geweben (Kork, Nährschicht der Samenschalen) vorkommen. Gegenüber dieser besonders von A. Tschirch vertretenen Ansicht muß hervorgehoben werden, daß rein statische Feststellungen in dieser Hinsicht nichts beweisen, daß aber bei Stoffwechselversuchen für eine Anzahl von Alkaloiden (Papaver-, Nicotiana-Alkaloide, Purinbasen u. a.) eine Wiederverwendung im Stoffwechsel nachgewiesen worden ist.

---

[1]) E. Bachmann, Emodin in Nephroma lusitanica, ein Beitrag z. Chem. d. Flechten, Ber. deutsch. bot. Ges., 1887, V, S. 192.

Bei der großen Mannigfaltigkeit, die wir in der Konstitution der Alkaloide finden, ist es von vorneherein ausgeschlossen, sie in physiologischer oder ökologischer Hinsicht als Einheit zu behandeln. Man kann also nicht von der Bedeutung der Alkaloide, sondern muß von der jedes einzelnen Alkaloids oder kleiner Alkaloidgruppen sprechen (Sabalitschka). Als Ausgangspunkt der Alkaloidbildung kommt der Eiweißstoffwechsel in Frage. Dies darf besonders für diejenigen Basen, die sog. „proteinogenen Amine", als sicher gelten, die durch Abspaltung von CO_2 aus Aminosäuren hervorgehen können. Manche heterocyclische Basen entstehen vielleicht durch Vereinigung niedermolekularer ungesättigter Stoffe.

Bei vielen Alkaloidpflanzen ist die Entstehung der Alkaloide mit der Umwandlung von Eiweiß verknüpft. In keimenden Samen von Strychnos nuxvomica und Lupinus luteus nimmt die Alkaloidmenge zunächst ab, dann zu (Sabalitschka u. Jungermann). Ebenso ist sichergestellt, daß sich Alkaloide beim Keimen der Samen von Nicotiana- und Cinchona-Arten, sowie von Papaver somniferum bilden. Alkaloide verschwinden u. a. beim Reifen der Mohnsamen, in den vegetativen Teilen von Theobroma Cacao und Paullinia cupana beim Reifen der Früchte und Samen (Weevers), in dem ersten Keimlingsstadium der Samen von Strychnos nux vomica und Lupinus luteus. Geeignete Stickstoffdüngung bewirkt Mehrbildung von Alkaloiden. Blausäure und Alkaloide kommen in der Regel nicht in einem und demselben Pflanzenteil vor (Rosenthaler).

In ökologischer Hinsicht hat man geglaubt, die Alkaloide, die ja meist Gifte sind, als ein Schutzmittel der Pflanze auffassen zu sollen. Man schloß dies besonders daraus, daß die großen Säugetiere die Giftpflanzen der Wiesen und Weiden unberührt lassen. In Wirklichkeit gibt es keine Alkaloidpflanze, die nicht ihre pflanzlichen oder tierischen Feinde hat. Datura fastuosa wird von Ziegen, Strychnos- und Atropafrüchte werden von Vögeln gefressen, Atropablätter nicht nur von Käfern (Haltica atropae) sondern auch von Hasen und Kaninchen. Letztere können bei ausschließlicher Atropa-Nahrung völlig normal ernährt werden. Außerordentlich groß ist die Zahl der niederen Tiere, die gegen Alkaloide immun sind; z. B. sind nicht weniger als 160 niedere Tiere bekannt, die von Nicotiana Tabacum leben. Ferner gibt es wohl keine Alkaloidpflanze, die nicht von pflanzlichen Schmarotzern, besonders Pilzen befallen würde. Gegen Cuscuta europaea sollen einige Alkaloidpflanzen geschützt sein.

Die Alkaloide bevorzugen parenchymatische Gewebe und die peripheren Stellen des Pflanzenkörpers, kommen ferner in Sklereiden (Jatrorrhiza), im Kork (Strychnos) und, wenn auch selten, in Oxalatzellen (Amaryllidaceen) vor, fehlen oft den Siebröhren (die Siebröhren einiger Ranunculaceen sollen nach Vanderlinden Alkaloide führen), bevorzugen aber die Geleitzellen. Besonders reichlich sind sie in den meristematischen Geweben (in Keimlingen von Strychnos vor dem Oxalat) zugegen, sowie in Milchsäften. Alle Organe der Pflanze führen Alkaloide, wenigstens in einem bestimmten Entwicklungsstadium. In den Pollenkörnern sind sie bisher nur selten ermittelt (China, Lotsy, Pilocarpus, Tunmann), was wohl mit der Schwierigkeit der Untersuchung zusammenhängt. Es scheint, daß die Alkaloide bei völliger Reife des Pollens schwinden.

Die Wanderung der Alkaloide im Pflanzenkörper ist experimentell durch Pfropfungsversuche erwiesen (A. Meyer und E. Schmidt, Javillier

u. a.[1]); auf eine Wanderung wiesen schon die Leitungsbahnen hin, die bei den Reaktionen an Längsschnitten schön hervortreten. Über die natürliche Form der Alkaloide ist wenig Sicheres bekannt; vielfach sind sie an Gerbstoffe gebunden (Rosenthaler u. Mosimann); das Morphin soll im Opium als Sulfat vorkommen. Doch treten Alkaloide auch in glykosidischer Bindung auf (Solanin, Casimirin, Consolidin, Moschatin, Achillein) und ihre Fähigkeit zur Wanderung legt den Gedanken nahe, ob die Glykosidform nicht weit häufiger besteht, als wir zur Zeit annehmen. Zur Bildung der Alkaloide ist, soweit bekannt, Belichtung nicht erforderlich; doch bedarf natürlich die Pflanze der primären im Licht gebildeten Assimilate, um die Alkaloide aufbauen zu können. Ferner ist in unseren Breiten höhere Temperatur von förderndem Einfluß. Über das Verhalten tropischer Alkaloidpflanzen in unseren Gewächshäusern machten Tunmann und Jenzer Mitteilungen. Alkaloidpflanzen unserer Zone scheinen in den Tropen trotz üppigen Gedeihens zuweilen arm an Alkaloid zu werden, wenigstens wird man aus Angaben von Peckolt hierauf schließen können.

In der lebenden Zelle sind die Basen im Zellsaft und in den Vakuolen des Plasmas gelöst. An Flächenschnitten (Epidermis von Nicotiana, Pilocarpus) kann man die Bildung des Niederschlages mit schwacher Jodlösung verfolgen. Im Plasma selbst entstehen keine Niederschläge. Im Endosperm kommen die Basen im Plasma vor, jedenfalls lassen sich sehr oft selbst bei starker Vergrößerung keine Vakuolen in der mit Aleuron vollgepfropften Zelle erkennen. Hier sind sie jedoch stets mit Öl gemengt, wodurch sie wahrscheinlich auf die Lebenstätigkeit des Plasmas nicht schädlich wirken. Ob die Alkaloide auch in besonderen Körnchen (s. Fritillaria) auftreten, bleibt noch strittig.

Seit Howard Kristalle von ausgeschiedenen Alkaloiden in der Chinarinde angetroffen haben wollte, begegnet man in der Literatur wiederholt Angaben über in Drogen auskristallisierte Alkaloide. Doch in keinem Falle werden Identitätsreaktionen mitgeteilt, fast stets fehlen sogar die, übrigens nichts oder doch nur weniges beweisenden Lösungsverhältnisse. Solange eingehende Identitätsreaktionen dieser Gebilde ausstehen (und diese zu erbringen dürfte in vielen Fällen schwierig sein), wird man derartige Angaben mit großer Vorsicht aufnehmen müssen. Der positive Ausfall der Reaktionen zeigt nur die Gegenwart der Alkaloide an und läßt den Entscheid, ob sich bei der Reaktion auch die Kristalle beteiligen, offen.

Früher war man allgemein der Ansicht, daß die Alkaloide in den Bastfasern entständen. Wigand[2]) sagt: „Die Alkaloide, namentlich

---

[1]) Über einen neueren Versuch dieser Art, bei dem Atropin aus Belladonna-Wurzel in aufgepropftes Solanum dulcamara überging, s. L. Daniel u. E. Potel, Greffes de Douce-Amère sur racines de Belladone, Compt. rend. acad. sciences, Paris, 1925, CLXXXI, S. 357.

[2]) A. Wigand, Lehrb. der Pharmakognosie, Berlin 1863, S. 112.

das Chinin hat seinen Sitz in der Bastschicht und zwar in den Bastzellen“ und Schacht[1]) hält es für wahrscheinlich, „daß alle Alkaloide Produkte der Bastzellen sind und daß auch das Chinin und Cinchonin nur in den Bastzellen der Chinarinden vorkommen“[2]). So konnte es nicht ausbleiben, daß auch in neuerer Zeit einige Mikrochemiker die Alkaloide in den Membranen angetroffen haben wollten und zuweilen wird behauptet, daß bei Drogen die Alkaloide in den Membranen vorkommen. Die Möglichkeit des Aufsaugens der Basen durch die Membran beim Absterben der Zellen soll nicht bestritten werden, doch sind die bisher angegebenen Fälle meist auf unrichtiges Arbeiten zurückzuführen. Die in den Plasmodesmen angegebenen Alkaloidfällungen bilden nach Tunmanns Befunden nur die bekannte Körnelung der Plasmafäden durch Jodreagentien u. a. (s. Plasmodesmen). Wenn wir berücksichtigen, daß die allermeisten Alkaloide auch beim Absterben der Zellen nicht in die Membran eindringen, so kommt man unschwer zu der Ansicht, daß dort, wo eine postmortale Membranspeicherung erfolgen soll, diese nicht durch die Basen, sondern durch jene Körper verursacht wird, an die die Basen gebunden sind. Vornehmlich Basen, die in gerbstoffartiger Bindung auftreten, können postmortal von den Membranen gespeichert werden. Auch von der Beschaffenheit der Membran wird die Aufsaugung beeinflußt. Verholzte Membranen neigen besonders zur Speicherung.

Ganz besondere Beachtung beansprucht bei mikrochemischen Alkaloidstudien das Material. Genaueren Untersuchungen über die Lokalisation in der Zelle muß lebendes Material zugrunde gelegt werden. Die geernteten Pflanzen sind tunlichst sofort zu untersuchen, enzymatische Prozesse können Veränderungen herbeiführen. Auch längeres Einstellen der Pflanzen in Wasser ist zu vermeiden. Bei einer fruchttragenden Colchicumpflanze, die 9 Tage im Wasser stand, waren in Blatt und Kaspel die am 1. Tage scharf eintretenden Alkaloidreaktionen nicht mehr zu erhalten. Unbedingt erforderlich und Erfolg versprechend erscheinen Vergleichsversuche an lebenden und getrockneten Pflanzen, sowie an Pflanzen, deren Enzyme sofort in geeigneter Weise abgetötet wurden. Die Art der Ausschaltung der Enzymwirkung wird sich nach den Löslichkeitsverhältnissen der nativ auftretenden Alkaloidverbindungen zu richten haben.

Das individuelle Verhalten der Pflanzen hinsichtlich ihres Alkaloidgehaltes ist ebenfalls zu berücksichtigen. Zuerst wurde man auf-

[1]) Schacht, Anatomie u. Phys. d. Gewächse, Berlin 1856, I, S. 400.

[2]) Wir müssen uns aber daran erinnern, daß Schacht noch die Milchröhren für „Bastzellen“ ansprach.

merksam auf die Individualität bei Cinchona, dann bei Erythroxylon (de Jong), Pilocarpus, Strychnos, Atropa belladonna (Tunmann). Viele Alkaloidpflanzen weisen eine weitgehende Individualität im Alkaloidgehalt auf, wovon man sich an Topfpflanzen überzeugen kann, die unter gleichen Bedingungen (Belichtung, Wärme, Boden) in Kultur stehen. Wasserkulturen von Strychnos haben Tunmann diese Ansicht bestätigt. Die Mikrochemie hat hiermit zu rechnen. Solange die Basen überall in größeren Mengen auftreten, werden Differenzen dadurch nicht herbeigeführt. Wo aber bei einer an sich alkaloidreichen Pflanze in einem bestimmten Gewebe nur Spuren von Alkaloid zugegen sind, können diese Spuren bei einer alkaloidarmen, auf gleichem Boden und unter gleichen Bedingungen gewachsenen, zweiten Pflanze der gleichen Art fehlen und widersprechende Befunde herbeiführen. „Differenzen verschiedener Autoren im mikrochemischen Alkaloidnachweis sind mithin nicht immer auf fehlerhafte Arbeitsmethoden zurückzuführen, sondern können auch in einem verschiedenen Alkaloidgehalt der untersuchten Pflanzen begründet sein“ (Tunmann, 1909). Die Reaktionen müssen an verschiedenen Pflanzen ausgeführt werden. Selbstverständlich werden uns Differenzen im Alkaloidgehalt ebenfalls entgegentreten bei wildwachsenden und kultivierten Pflanzen, die unter verschiedenen Bedingungen wachsen.

Eine andere Fehlerquelle ist bei jenen Objekten gegeben, bei denen noch nicht völlig reife Früchte und Samen untersucht werden müssen und die Alkaloide bei der Reife abnehmen. Die Abnahme erfolgt in bestimmten Schichten bis zum Schwinden. Hier ist naturgemäß das jeweilige Stadium der Reife von großer Bedeutung und kann bei den verschiedenen Autoren ebenfalls zu erheblichen Differenzen führen (s. Conium). Nur systematische Untersuchungen, die alle Entwicklungsstadien berücksichtigen, können dann zu einwandfreien Ergebnissen führen.

Bei den Lokalisationsangaben findet man in der Literatur vorzüglich Differenzen über das Auftreten der Alkaloide im Blatte. Einige Autoren finden die Basen in der Epidermis, andere auch oder nur in angrenzenden chlorophyllhaltigen Zellen (Palisaden). In dieser Hinsicht sei auf die Tatsache hingewiesen, daß die inneren tangentialen Wände der Epidermiszellen oft große Tüpfel führen, so daß ein schneller Übertritt der Basen in benachbarte Zellen (vielleicht erst bei der Präparation) nicht ausgeschlossen erscheint.

Beim mikrochemischen Alkaloidnachweis sind Kontrollreaktionen unbedingt erforderlich, da wir nicht im Besitz völlig einwandfreier

Reaktionen sind und unsere allgemeinen Alkaloid-Reagentien nicht nur mit Alkaloiden, sondern auch mit Eiweißstoffen, Bitterstoffen (Laktonen), zum Teil auch mit Glykosiden und Kohlenhydraten reagieren. Selbst organisierte Gebilde (Zellkern, Chromatophoren) können zu Irrtümern Anlaß geben (s. Fig. 100). Es müssen — Schnitte (S. 29) geprüft und mit +Schnitten verglichen werden. Von allen Flüssigkeiten, die zur Herstellung alkaloidfreier Schnitte empfohlen wurden, kann nur der Weinsäurealkohol (1 : 20) allgemein benutzt werden. Die Entfernung der Alkaloide mit Weinsäure-Alkohol wurde von Stas (Liebigs Ann., 1853, LXXXIV, S. 379) angegeben, von Otto (Anl. z. Ausmitt. d. Gifte, III. Aufl., S. 35) verbessert und gelangte auf unserem Gebiete zuerst durch Errera[1]) zur Anwendung. Über die Dauer der Mazeration entscheidet die Beschaffenheit des Materials. Die Angabe Molles (1895), daß sich die Basen schon durch 15—25 Minuten langes Eintauchen der Schnitte in Weinsäure-Alkohol entfernen lassen, kann für die von ihm untersuchten vegetativen Teile der Solaneen hier und da zutreffen, hat aber keine allgemeine Gültigkeit. Bei Samen und Früchten (Conium, Barth, 1898), zumal bei starkwandigen (Strychnos) gelingt die Entfernung sämtlicher Alkaloide erst nach mehreren Tagen. Vergleichende Prüfungen führten zu dem Schluß, daß selbst diese Zeit nicht immer genügt, „namentlich dann nicht, wenn man das Mazerationsgefäß nicht umschütteln kann. Man mazeriert am besten gleich bei Beginn einer Untersuchung eine größere Anzahl Präparate in einem kleinen, geschlossenen Arzneifläschchen mindestens eine Woche lang unter häufigem Umschütteln und entnimmt die Präparate bei Bedarf, muß sie aber vorher auswaschen“ (Tunmann, 1909)[2]). Die Alkaloide sind nun entfernt, die Eiweißkörper im allgemeinen aber nicht (Ritthausens Fibrin ausgenommen). Nun werden Parallelreaktionen an +- und — Schnitten vorgenommen. Die Reaktionen sind Fällungs- oder Farbenreaktionen. Daneben gelangen noch Spezialreagentien zur Anwendung, vornehmlich aber Jod-, Brom- und Säuredämpfe (S. 20). Schwer sichtbare Fällungen werden durch Umsetzungen weiter identifiziert (S. 19).

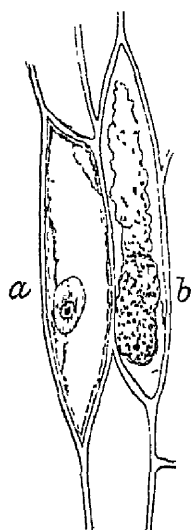



Fig. 100. Allium porrum (Epidermis), *a*) eine lebende Zelle mit Zellkern, der bei *b*) nach

saft entstandenen Niederschlag vortäuscht (Tunmann)

[1]) L. Errera, Sur la distinction microchimique des alcaloides et des matières protéiques, Ann. d. l. Soc. Belg. Micr., 1889, XIII, S. 118.

[2]) Rascher kommt man zum Ziel, wenn man die Schnitte mit der weingeistigen Weinsäurelösung auskocht.

Die Zusammensetzung der hauptsächlichsten Alkaloidreagentien ist nachstehend angegeben. Die besten und allgemein benutzbaren Reagentien sind an die Spitze gestellt.

Brombromkalium (Siim Jensen, 20,0 Kaliumbromid, 100,0 Wasser, Brom im Überschuß) ist ein vorzügliches Reagens, da die Stärke nur braun gefärbt wird, ebenso Bromwasser (Barth, konz. wässerige Lösung von Brom). Zuweilen wirken verdünnte Lösungen besser (Tunmann). Gleich gut wirkt Jodjodkalium (Bouchardat, Errera, am besten aus 1,0 Jod, 1,0 Kaliumjodid in 100 ccm Wasser, zuweilen ist eine ½ proz. Lösung geeigneter, Pilocarpus). Der Niederschlag ist fast stets amorph und löst sich in unterschwefligsaurem Natron; gleichzeitig werden Stärke, Eiweißkörper u. a. gefärbt, wodurch der Niederschlag oft schwer sichtbar wird. Chlorzinkjod (Barth, 20,0 Chlorzink, 6,5 Kaliumjodid, 1,3 Jod, 10,5 Wasser) hat in Geweben beschränkten Wirkungskreis, da nicht nur Stärke, sondern auch Zellulose u. a. gefärbt werden, ein Nachteil, der besonders bei längerer Einwirkung sehr ins Gewicht fällt[1]). Sehr gute Resultate geben ferner: Kaliumquecksilberjodid (Mayer, 1,354 Quecksilberchlorid, 4,97 Kaliumjodid in 100,0 Wasser), ferner nach Herder: Caesium-, Kalzium-, Strontium-, Baryumquecksilberjodid (diese werden bereitet aus je 1,354 Quecksilberchlorid in 100,0 Wasser und 7,77 Caesiumjodid, oder 4,394 Kalziumjodid, oder 6,725 Strontiumjodid oder 6,389 Baryumjodid). Die entstehenden Niederschläge sind im allgemeinen schwer löslich und zwar um so schwerer, je höher das Atomgewicht der benutzten Alkali- resp. Erdalkalimetalle ist. Die Kristallisation der Niederschläge wird gefördert durch Anwendung der Reagentien in 30 proz. wässeriger Chloralhydratlösung. Die Bestandteile werden statt in Wasser in Chloralhydrat gelöst. Dadurch werden die Präparate gleichzeitig aufgehellt. Leider wird durch Anwendung der Chlorallösung die Empfindlichkeitsgrenze ganz bedeutend herabgesetzt. Kaliumwismutjodid (Dragendorff, Wismutjodid in konz. wässeriger Jodkaliumlösung in der Wärme gelöst, das heiße Filtrat wird mit dem gleichen Vol. kalt gesättigter Jodkaliumlösung versetzt. Haltbarer ist die Lösung nach Thresh: 1,8 Kaliumjodid, 45 ccm Salzsäure, 30 ccm Liquor Bismuti [dieser aus: 2,5 Wismut in 70,0 Salpetersäure gelöst, mit 60,0 Zitronensäure versetzt, durch Ammoniak schwach alkalisch gemacht und mit Wasser auf 600 ccm aufgefüllt]). Zu den besten Reagentien zählen Platin- und Goldchlorid (1 : 20), die kristallinische, schwer lösliche und gut sichtbare Niederschläge geben und im Verein mit den Jodreagentien häufig zur Diagnose ausreichen. Zusatz einer Spur Salzsäure befördert die Kristallisation. Nicht ganz so gut wirkt Quecksilberchlorid (3 proz. wässerige Lösung).

In vereinzelten Fällen (Morphin) wirkt Kalium-Quecksilberbromid (50 g Quecksilberchlorid 1 : 20 + 5 g Kaliumbromid) besser wie Quecksilberchlorid.

Wenig eingeführt hat sich, wie es scheint, Natronlauge (10 %); sie gibt amorphe, selten kristallinische Fällungen, die jedoch gut sichtbar sind. Weniger Beachtung verdient jetzt Kalilauge (10 %), die vielfach früher benutzt wurde (China) und alkoholische Ammoniaklösung (China), die auch mit Pflanzen-

[1]) Dagegen ist Chlorzinkjod sehr geeignet zum Nachweis vieler isolierter, wenn auch unreiner Alkaloide (O. Tunmann, Apoth.-Ztg., 1917, XXXII, S. 76).

säuren reagiert und meist erst nach dem Verdunsten die Niederschläge erkennen läßt. Nur in einzelnen Fällen wird man Ferro- und Ferricyankalium, Rhodankalium, Kaliumdichromat (sämtlich in 5proz. wässeriger Lösung, Barth) heranziehen, sowie Kupfersulfat (10 %, bei Conium). Pikrinsäurelösung (1 : 100, die Lösung dringt schwer in die Gewebe und liefert meist amorphe Niederschläge; bessere Resultate erzielt man mit folgender Lösung: 5,0 konz. wässerige Pikrinsäurelösung, 20,0 Wasser, 0,5 Salzsäure, Tunmann). Nicht viel besser wirkt Pikrolonsäure (von Matthes und Ramstedt [Arch. d. Pharm., 1907] bei narkotischen Präparaten benutzt, von Tunmann bei Schnitten, 0,1 Pikrolonsäure, 8 Alkohol, 7 Wasser). Kaliumkadmiumjodid (Marmé, 1 Teil Kadmiumjodid, 2 Teile Kaliumjodid, 7 Teile Wasser) steht den anderen Jodreagentien bedeutend nach. In schwach schwefelsaurer Lösung (Lepage) ist die Wirkung ebenfalls nicht viel besser. Tannin (10proz. wässerige Lösung), gibt zwar bräunliche Fällungen, dringt aber sehr schwer ein und die zuerst von Barth empfohlene mehrtägige Mazeration größerer Pflanzenstücke ist umständlich und lohnt nicht die zeitraubende Arbeit (beim Schneiden wird oft alles mißfarbig, sogar schwarz). Ferrichlorid (Barth, in 5proz. Lösung) wird man nur selten einmal heranziehen (Gerbstoffällungen). Reineckes Salz = [Tetrarhodanato-Diamminochromi]-Ammonium (Rosenthaler, Niethammer) in gesättigter wässeriger Lösung, alizarinsulfosaures Natrium (Rosenthaler) in gesättigter wässeriger Lösung, Kaliumperjodat (Rosenthaler). Rufiansäure, (Zimmermann, Rosenthaler). Ganz entbehrlich sind: Phosphormolybdänsäure (Sonnenschein, eine salpetersaure Lösung von Ammoniummolybdat, wird mit Phosphorsäure gefällt, der Niederschlag wird ausgewaschen und mit Königswasser gekocht, bis alles Ammoniak zersetzt ist, dann wird zur Trockne verdampft und die Phosphormolybdänsäure in 10proz. Salpetersäure gelöst). Phosphorwolframsäure (Scheibler, eine Lösung von Natriumwolframat wird mit etwas offizineller Phosphorsäure versetzt).

In denjenigen Fällen, in denen die Alkaloide mit Gerbstoffen vergesellschaftet sind, verwendet man vorteilhaft zum Lokalisationsnachweis starksaure Reagentien: Brombromkali (salzsauer): Filtriertes Gemisch von gleichen Teilen Brombromkalium (s. oben) und Salzsäure (spez. Gew. 1,19). Silikowolframsäure (salzsauer): Zu einer kalten konzentrierten wässerigen Lösung von Silikowolframsäure setzt man ebensoviel konzentrierte Salzsäure (spez. Gew. 1,19). Ein Gemisch von letzterer Lösung und Vanillin-Salzsäure ist geeignet zum gleichzeitigen Nachweis von Alkaloiden und solchen Gerbstoffen, die mit Vanillin-Salzsäure eine Rotfärbung geben (Rosenthaler u. Mosimann)[1]).

Zahlreiche Angaben über Alkaloidfällungsmittel finden sich in den in der österr. bot. Zeitschr. erschienen Arbeiten von G. Klein und seinen Schülern. Vgl. u. a. die Angaben über Colchicin, Berberin, Ricinin, Cocain, Solanaceen- und Cinchona-Alkaloide.

[1]) L. Rosenthaler u. M. Mosimann, Über das gemeinsame Vorkommen von Alkaloiden und Tanniden, Schweiz. Apotheker-Ztg., 1924, LXII, S. 13; M. Mosimann, Zur Kenntnis der natürlichen Form der Alkaloide, Inaug.-Diss. Bern, 1923.

Eine Anzahl von Reagentien, die in den letzten Jahren zum mikrochemischen Nachweis der Alkaloide herangezogen wurden, sind zu Lokalisationsstudien noch nicht verwendet worden. so Jodsäure, (Tetranitrito-Diamminokobalti)-Kalium, β-Anthrachinon-monosulfosäure, Perjodsäure, alizarinsulfosaures Natrium, Rufiansäure (Zimmermann, Rosenthaler).

Brauchbare Farbenreaktionen erhält man mit den folgenden Reagentien: Reine Schwefelsäure (konz. und in bestimmten Fällen verdünnt) und reine Salpetersäure. Erdmanns Reagens (10 Tropfen verd. Salpetersäure [aus 10 Tropfen 30proz. Salpetersäure in 100 ccm Wasser, 20 g reine konz. Schwefelsäure). Die Schwefelsäure läßt sich vorteilhaft durch eine hochprozentige wässerige Chloralhydratlösung ersetzen, so beim Nachweis von Morphin, Narkotin, Brucin. Diese Färbungen zeichnen sich durch relativ größere Haltbarkeit aus. Vanadinschwefelsäure (Mandelin, Ammoniumvanadanat 0,1 reine konz. Schwefelsäure 20,0), färbt Strychnin blauviolett, Atropin gelbrot, Akonitin hellbraun, Brucin blutrot, Colchicin und Coniin grün, Digitalin dunkelbraun, Chinin blaugrün. Molybdänschwefelsäure (Froehde, molybdänsaures Natrium 0,01, konz. Schwefelsäure 1 ccm, frisch bereiten; ähnlich wirkt molybdänsaures Ammonium 0,1, konz. Schwefelsäure 1,6, durch Erwärmen gelöst, Buckingham). Beschränkte Verwendung besitzen Cersulfatschwefelsäure (0,1 Cersulfat in 10 ccm Schwefelsäure) und Selenschwefelsäure (Lindt, 5 Tropfen Selensäure, spez. Gew. 1,4 und 1—2 Tropfen Salpetersäure, spez. Gew. 1,2 oder nach Renteln: 0,3 selensaures Natrium, 8,0 Wasser, 6 ccm Schwefelsäure).

Zum Nachweis von Morphin und seinen Verwandten eignet sich die Violettfärbung mit Formalin-Schwefelsäure (5 ccm Schwefelsäure, 1 Tropfen Formalin). Andere derartige Reagentien sind: Perhydrol-Schwefelsäure (1 Vol. Perhydrol mit 10 Vol. Schwefelsäure unter Kühlung gemischt, Schär); Chinin wird damit zitronengelb, Strychnin purpurrot, Hydrastin schokoladebraun, Emetin orangerot usw. p-Dimethyl-Amidobenzaldehyd-Schwefelsäure (2,0 Reagens 6,0 Schwefelsäure, 0,4 g Wasser, Wasicky) gibt mit Atropin u. a. Alkaloiden beim Erwärmen Rotfärbung.

Die Empfindlichkeitsgrenze (Grenzkonzentration) für einige chemisch reine Alkaloide hat Springer[1]) ermittelt. Zur Ausführung wurden zwei Tropfen Reagenslösung zu ½ ccm Alkaloidlösung zugefügt, welche sich in einem, auf schwarzer Unterlage ruhenden Uhrglase befand, und der innerhalb ½ Minute entstehende Niederschlag beobachtet. Die gefundenen Werte bieten auch für unsere Zwecke Interesse, wenn auch die Brauchbarkeit der Alkaloidreagentien in der Pflanzenmikrochemie keineswegs von einer hohen Empfindlichkeitsgrenze allein abhängt. Die Empfindlichkeitsgrenze betrug 1 zu den angegebenen Werten bei wässerigen Lösungen reiner Alkaloide, die mit Ausnahme von Brucin und Atropin mit 1 % Alkohol versetzt waren. Die angeführten Zahlen geben die Werte in Tausenden, die Empfindlichkeitsgrenze von KHgJ mit Brucin ist daher 1 : 25000, mit Koniin 1:1200.

[1]) E. Springer, Die Empfindlichkeit der Alkaloidfällungsreagentien und ihre Fällungsgrenzen, Apoth.-Ztg., 1902, XVII, S. 201.

	Brucin	Atropin	Chinin	Koffein	Veratrin	Koniin	Nikotin
KHgJ[1])	25	10	100	—	15	1,2	15
Ta	8	3	1,2	3	2	0,1	0,5
Pl	1,5	1,2	0,7	0,06	0,5	0,1	5
Au	28	4	14	0,4	6,5	0,1	10
Jjk	40	40	150	3	15	10	1
Pi	2,850	0,5	30	—	1,2	0,1	5
Pmo	2	2	8	—	3	2,5	12
Pw	1,4	0,8	4	—	1	1	10,5
Kcdj	12	1,2	8	—	5	1	10
Kznj	4	1	6	—	4	0,8	7,5
Wij	5	4	50	60	6	6	20

	Morphin	Narcein	Kodein	Thebain	Strychnin	Akonitin	Emetin
KHgJ	1	0,4	10	50	65	12,8	25
Ta	0,3	2	0,06	8	2	2	6,5
Pl	0,12	0,3	0,2	0,9	2,5	—	3
Au	3	2,2	2,5	16	16	6,4	3,2
Jjk	14	12,8	65	50	65	15	25
Pi	—	1,5	0,5	6,4	9	1	25
Pmo	6	2,5	10	25	3.2	2,5	3,2
Pw	6	2	8	12,8	3	2	1,5
Kcdj	1	1,5	1,5	12,5	12	3,5	25
Kznj	0,3	1,5	0,8	10	0,4	3,5	15
Wij	5	10	40	60	200	10	25

Die hier mitgeteilten Springerschen Zahlen sollen nur Anhaltspunkte bieten und sind auf die Zelle mit ihren andersartigen Verhältnissen nicht ohne weiteres übertragbar. Vgl. dazu A. Mayrhofer, Mikrochemie der Arzneimittel und Gifte Teil II (1928), S. 2.

Über die Höhe der Alkaloidmengen in den einzelnen Zellen liegen wenige Angaben vor. Selbst Wahrscheinlichkeitsberechnungen sind mit sehr großen Fehlern behaftet. Gerock und Skippari berechnen die Größe einer Endospermzelle des Strychnossamen mit 0,00020475 cmm und daraus und aus dem spezifischen Gewicht der Samen das Gewicht einer Zelle mit 0,00027314 mg. Nun nehmen sie 5% Alkaloid und zwar Strychnin zu Brucin im Verhältnis 1 : 2 an, so

[1]) KHgJ = Kaliumquecksilberjodid, Ta = Tannin, Pl = Platinchlorid, Au = Goldchlorid, Jjk = Jodjodkalium, Pi = Pikrinsäure, Pmo = Phosphormolybdänsäure, Pw = Phosphorwolframsäure, Kcdj = Kaliumkadmiumjodid, Kznj = Kaliumzinkjodid, Wij = Wismutjodidjodkalium.

Im folgenden sind die Fällungsgrenzen der betreffenden Alkaloide in sauren Lösungen mit den gleichen Reagentien zusammengestellt:

	Brucin in $H_2O + 3\ SO_4H_2$	Atropin in $H_2O + 3\ SO_4H_2$	Chinin $+ 3\ HCl$	Koffein $+ 3\ SO_4H_2$	Veratrin $+ 5\ HCl$	Solanin $+ 5\ HCl$	Cinchonin $+ 2\ SO_4H_2$
KHgJ	50	15	130	22	20	10	250
Ta	6,4	3,5	1,5	4	2,3	2	250
Pl	1,5	1,5	0,9	0,08	0,45	0,4	4
Au	25	4,5	12,5	0,85	6,4	1	160
Jjk	65	65	200	4	20	—	200
Pi	5	0,5	40	—	2	0,8	110
Pmo	8	16	30	32	12	4	100
Pw	6,4	1,5	20	12	6	2,5	240
Kcdj	8	1,8	9	—	5	2	100
Kznj	2	0,85	6,5	—	3,5	2	65
Wij	10	5	150	100	8	35	200

	Koniin $+ 3\ HCl$	Nikotin $+ 3\ HCl$	Morphin $+ 3\ HCl$	Narkotin $+ 3\ HCl$	Narcein $+ 3\ HCl$	Kodein $+ 3\ PO_4H$	Thebain $+ 5\ HCl$	Strychnin $+ 3\ NO\ H_3$	Akonitin $+ 3\ HCl$	Emetin $+ 5\ HCl$
KHgJ	1	20	1,2	50	12,8	13	60	100	12,8	35
Ta	0,1	1	0,5	6,4	2	0,15	10	3,4	3,2	6,5
Pl	–	5	0,2	0,8	0,6	0.275	1	2	—	0,8
Au	– –	120	4,2	12	4	3	16	15	8	2,5
Jjk	10	20	24	50	25	100	80	100	22	25
Pi	—	6	– —	6,4	3,2	0,6	6,4	10	1,6	32
Pmo	10	40	20	14	4	50	50	60	6,4	6,4
Pw	6	21	20	12,8	4	30	25	100	7,5	3,2
Kcdj	1	11	1,8	10	4	1,5	8	8	3	12,8
Kznj	0,8	8	0,6	10	3,2	0,8	8	2	3,5	15
Wij	10	40	16	25	20	60	80	400	11	28

daß eine Endospermzelle 0,000004552 mg Strychnin und 0,000009104 mg Brucin enthalten würde. Es muß bemerkt werden, daß der Alkaloidgehalt recht hoch angenommen ist. Meist finden sich 2—3% Alkaloide, dann würden sich die berechneten Mengen um fast 50% erniedrigen. Herder meint nun, daß beim Eintragen mehrerer Schnitte in einen Tropfen Reagenslösung diese Schnitte 500 Zellen enthalten könnten, und glaubt „daraus als höchste Durchschnittsempfindlichkeitsgrenze einer Reagenzlösung das Verhältnis 1 : 7323" beim Strychnossamen angeben zu dürfen. Diese Berechnung wäre doch nur dann zulässig, wenn die Alkaloide sämtlicher Zellen heraustreten und auf einmal im Untersuchungstropfen in Reaktion treten würden. Derartige Fälle haben wir allerdings häufig, meist dort, wo die Niederschläge im Reagenztropfen oder auf den Schnitten entstehen. Bei Strychnos und stets bei Bildung von Niederschlägen innerhalb nicht angeschnittener Zellen muß doch die Alkaloidmenge jeder einzelnen Zelle für sich in Reaktion treten. Man wird sagen können, daß Reagentien, die unter 1 : 10000 reagieren, nur in Ausnahmefällen in den Zellen selbst Reaktionen auslösen werden. Nach Kellers makrochemischen Befunden reagiert Kaliumdichromat mit Emetin und Cephaelin nur 1 : 1000. Tunmann hat, entgegen der Literatur, in Schnitten von Uragoga niemals Reaktionen mit diesem Reagens erhalten. Ein junges Teeblatt führt kaum 0,002 g Coffein. Daher die Schwierigkeit in der Lokalisationsermittelung, die durch den anwesenden Gerbstoff noch erhöht wird. Ein Blütenstielchen von Pilocarpus enthält im Mittel nur 0,002 g Alkaloid. Nehmen wir an, daß dieses nur 7 mm lang sei und etwa 200 Schnitte gäbe. Mit jedem Schnitt von 35 μ Dicke erhalten wir eine intensive Reaktion in den Zellen. Da aber ein solcher Schnitt mindestens 250 Alkaloidzellen führt, so können es nur Bruchteile eines Mikromilligramms an Alkaloid sein, die die Reaktion bedingen; denn bei Alkaloidpflanzen werden die makrochemischen Befunde über den Gehalt den Tatsachen nahe kommen.

Die mit pflanzlichen Objekten erhaltenen Alkaloidfällungen stimmen in der Kristallform nur selten mit jenen überein, die chemisch reine Alkaloide am Objektträger geben. In der Pflanze liegen die Alkaloide in einer Form vor, die uns vielfach noch unbekannt ist, und andere Pflanzenstoffe modifizieren die Reaktionsprodukte, verhindern häufig die Kristallisation.

Bei der Untersuchung von Pflanzen, über die makrochemische Befunde noch nicht vorliegen oder deren Alkaloide zu Kontrollreaktionen nicht im Handel zu haben sind, wird man nach dem Verfahren von Stas-Otto (Ausziehen des zerkleinerten Materials mit Weinsäure-Alkohol und Reinigen der Auszüge; näheres s. L. Rosenthaler, Grund-

züge der chemischen Pflanzenuntersuchung und Nachweis organischer Verbindungen) eine kleine Menge von Rohalkaloiden herstellen und mit diesen Aufklärungsreaktionen ausführen.

Gnetaceae

Ephedra

In Ephedra-Arten (E. sinica Stapf, E. Shennungiana Tang, beide die „Ma-Huang"-Droge liefernd, E. vulgaris Rich.) kommt eine Gruppe von Alkaloiden vor, von denen das Ephedrin das praktisch wichtigste ist. Mit dem d-Nor-isoephedrin, das neben Ephedrin in der „Ma-Huang"-Droge vorkommt, hat sich das Cathin der Celastracee Catha edulis als identisch erwiesen. Ephedrin aus „Ma-Huang" schmilzt bei 43°. Sublimierbar. Löslich in Wasser, Weingeist, Chloroform, Äther. Gibt mit Kupfersulfat und Natronlauge eine Purpurfärbung, die sich mit Äther ausschütteln läßt.

Gilg und Schürhoff[1]) haben aus jungen Zweigen der Ma-Huang-Droge ein meist aus öligen Tröpfchen bestehendes Mikro-Sublimat erhalten, das mit Goldchloridlösung nach mehreren Stunden splitterartige oder zweigförmige Kristalle der Ephedrin-Goldchlorid-Verbindung (Smp. 128—131°) lieferte. Von Ephedra equisetina Bunge wurde ebenso eine nadelartige Goldchlorid-Verbindung erhalten.

Die Reaktionen, die Gilg und Schürhoff bei Ephedra-Arten mit Ferrichlorid, ammoniakalischem Silbernitrat, Goldchlorid und Ferrichlorid — Kaliumferrizyanid eintreten sahen, sind wohl in erster Linie durch Gerbstoffe hervorgerufen.

Coniferae

Taxus baccata L.

Taxin (Marmé), das Alkaloid von Taxus baccata, scheint in der ganzen Pflanze mit Ausnahme des Arillus vorzukommen. In den Blättern 0,2 %—1,4 % (in der Trockensubstanz); in den Kernen 0,25 %. Die Blätter männlicher Pflanzen enthalten mehr, als die weiblicher.

Weißes Pulver, erweicht bei 97°, schmilzt unter Zersetzung bei 105—110°. Unlöslich in Wasser und Petroläther, leicht löslich in Weingeist u. dgl. Spaltung mit verdünnten Säuren oder Hitze ergibt u. a. Zimtsäure.

Taxin soll funktionell das in Taxus fehlende Harz vertreten[2]). Konzentrierte Schwefelsäure oder Salpetersäure lösen mit rotvioletter, Dichromat-Schwefelsäure mit purpurblauer, konz. Salzsäure mit violetter bis violettgrauer Farbe. Mit ein wenig Wasser verdünntes Mandelinsches Reagens gibt hellrote, weingeistige Salzsäure grüne Färbung.

---

[1]) E. Gilg u. P. N. Schürhoff, Die ephedrinhaltigen Stammpflanzen der „Ma-Huang"-Droge, Arch. d. Pharmaz., 1930, CCLXVIII, S. 233.

[2]) R. Neumann, Aus Leben, Sage und Geschichte der Eibe, Ber. Gymnas. Bautzen; Ref. in Bot. Centralbl. 1910, CXIII, S. 221.

Die Lokalisation wurde studiert von Sauvan,[1]) Russel[2]), Goris[3]), Rosenthaler und Mosimann[4]). Goris verwendete Jodjodkalium, Rosenthaler und Mosimann benützten in erster Linie Silikowolframsäure. Letztere fanden Alkaloid im Stengel: in Epidermis, innerer Rindenschicht, Mark und den Markstrahlen des Holzteils. Im Blatt: im Schwammparenchymgewebe; Goris fand es im Blatt auch in den Epidermzellen, besonders in sehr jungen Blättern in denen der Nerven.

In den Alkaloidzellen findet sich Tannid (Goris, Rosenthaler und Mosimann).

Monocotyledonen

Palmae

Areca catechu L.

Die Arekasamen enthalten in einer Gesamtmenge bis zu 1,5 % mehrere Alkaloide, von denen Arecolin und Arecain vorherrschen (Bombelon, Jahns u. a.).

Arekolin ist eine farblose bei ca. 220° siedende Flüssigkeit. Leicht löslich in Wasser, Weingeist, Äther und Chloroform. Es besitzt keine mikrochemisch verwertbaren besonderen Reaktionen. Von den anderen Arekaalkaloiden gibt Guvacin mit Ferrichlorid eine tiefrote Färbung.

Arecolin läßt sich mit nachstehenden Reagentien nachweisen: Jodjodkalium, Kaliumwismutjodid[5]) (rotbraune, undeutlich kristallinische Ballen), Pikrinsäure, Goldchlorid[6]), Pikrolonsäure (gelbe Ballen und Sphärokristalle, Fig. 101)[7]), Platincyanid (bei Umrandung des Deckglases mit Wachs nach mehreren Stunden kleine Kristalle), konzentrierte Salzsäure (schwach gelbe Kristallballen), Salz- oder Salpetersäuredämpfe (nach 2—3 Tagen Kristalle). Die mit Säuredämpfen behandelten Präparate werden in Paraffinöl durchmustert (Fig. 101). Kaliumperman-

[1]) L. Sauvan, Localisation des principes actifs dans quelques végétaux, Journ. bot. 1896, X, S. 126 u. 157.

[2]) Russell, Recherches sur la localisation de la taxine chez l'if Assoc. franç. pour l'avancement des sciences, 1901, S. 693.

[3]) A. Goris, Localisation et rôle des alcaloides et des glucosides chez les végétaux, 2. édit. Paris, 1914, S. 35.

[4]) L. Rosenthaler u. M. Mosimann, Studien über die natürliche chemische Form der Alkaloide. 1. Über das gemeinsame Vorkommen von Alkaloiden und Tanniden, Schweiz. Apothek.-Ztg., 1924, LXII, S. 13.

[5]) Th. Osenbrüg, Über die Entwicklung des Samens der Areca catechu L. und die Bedeutung der Ruminationen, Dissertation Marburg, 1894.

[6]) H. Barth, Studien über den mikrochemischen Nachweis von Alkaloiden in pharmaz. verwendeten Drogen, Dissertation, Zürich, 1898, S. 40.

[7]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie der Arekanuß, Pharm. Post, 1911, XLIV, S. 703.

ganatlösung, die braunen Niederschlag hervorruft, liefert eine unklare Reaktion. Mit Silikowolframsäure erhält man mit dem Gemisch der Areka-Alkaloide drusenförmige Kristallbildungen, die aber im Gewebe schlecht auftreten, mit Brombromkalium (sauer) Tropfen. Die Reaktionen lassen sich recht gut mit den Nuces Arecae des Handels erzielen. Präparate lassen sich aus dem zerklopften Samen mit starkem Messer bequem anfertigen. Die schnellste Reaktion liefert Kaliumwismutjodid. Einige Präparate werden in einen kleinen Tropfen verdünnter Salzsäure gelegt (1 : 10), so daß die Schnitte gerade befeuchtet sind und sich glatt rollen, dann wird das Deckglas aufgelegt und das Reagens zugefügt. Bereits nach wenigen Minuten füllen sich die Endospermzellen mit rotbraunen Ballen an, deren kristallinische Natur aber nur am Rande der Ballen und Klumpen zu erkennen ist. Natürlich müssen —Präparate zum Vergleich herangezogen werden.

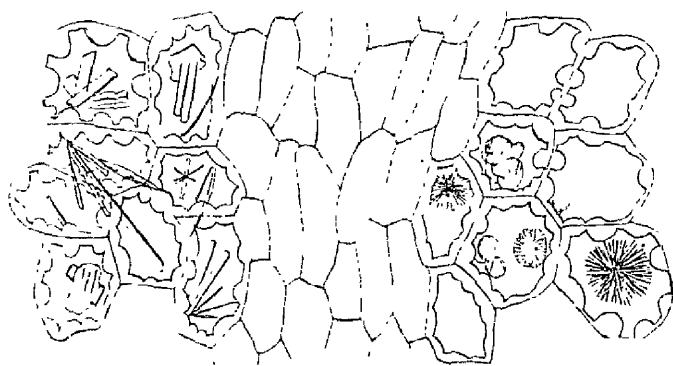



Fig. 101. Areca catechu (Samen), Endosperm, in der Mitte Rumination. Arecolinausscheidungen mit Salpetersäuredampf (links), mit Pikrolonsäure (rechts) (Tunmann)

Das Alkaloid Arecain läßt sich gut mit Natronlauge nachweisen (graugelbe Kristallballen).

Der Sitz der Alkaloide ist jedenfalls in der Hauptsache das Endosperm (Barth, Tunmann, Rosenthaler und Mosimann) und nicht, wie Osenbrüg meinte, das Ruminationsgewebe, immerhin waren auch in einigen Zellen des letzteren mit Brombromkalium Tropfen zu beobachten.

Die alkaloidführenden Zellen des Endosperms sind frei von Tannid (Rosenthaler u. Mosimann[1])).

Liliaceae

Colchicum autumnale L.

Colchicin (Pelletier u. Caventou, Geiger u. Hesse, Hubler) wurde dargestellt aus Colchicum autumnale L., Gloriosa superba L. und Merendera bulbocodium Ram.; in Gloriosa superba kommt daneben Methylcolchicin vor. Die mikrochemischen Reaktionen des Colchicins hat Albo noch in einer Reihe von Colchicum-Arten, sowie in den Blättern von Merendera caucasica Biel. u. M. sobolifera Fisch. erhalten.

[1]) L. Rosenthaler u. M. Mosimann l. c. S. 439, 4.

Colchicin ist wasserfrei ein gelbliches Pulver, das bei 142° erweicht und unscharf bei 147° schmilzt. Leicht löslich in Wasser, Weingeist und Chloroform, schwer in Äther, nicht in Petroläther. Phosphorwolframsäure fällt bei Gegenwart von 1 % Salzsäure noch in Verdünnung 1 : 250 000, mit Silikowolframsäure noch 1 : 10 000.

Von den Farbenreaktionen des Colchicins kommt für mikrochemische Zwecke die starke Gelbfärbung in Betracht, die es mit konzentrierten Säuren gibt.

Für Colchicin ist ferner nach Klein u. Pollauf[1]) die Reaktion mit Platinrhodanid (5 % Platinchlorid + 5 % Kaliumrhodanid) charakteristisch. Bei Colchicin-Verdünnungen 1 : 1000—1 : 250 000 bilden sich zarte gelbe, aus drei sich in einem Punkt kreuzenden Lanzetten gebildete Kristallformen, die beim Abblenden blau aufleuchten und eine Auslöschungsschiefe von 6—10° besitzen. Sichere Erfassungsgrenze bei 0,2 γ. Mit dem Platinrhodanidreagens ließ sich Colchicin auch in Schnitten nachweisen, doch liegen die Kristalle außerhalb der Schnitte.

Colchicin kommt (nach Albo in freiem Zustande) in allen Teilen von C. autumnale vor, im Knollen (0,2 %), in Blättern (Spuren), in Blüten (0,1 %), im Samen (je nach der Reife und dem Lagern 0,2—0,4 %), vornehmlich in der Samenschale (bis 0,4 %). Auf den Alkaloidgehalt ist die Witterung von großem Einfluß. In den kalten Sommern 1909 und 1910 nahm der Gehalt der Samen wildwachsender Pflanzen der Rhonegegend stark ab[2]); er betrug 1907: 0,19, 1908: 0,16, 1909: 0,144, 1910: 0,148 %.

Fourment u. Rocques fanden in den getrockneten Zwiebeln von Merendera bulbocodium 0,9 % Colchicin. Klein u. Pollauf erhielten ferner die Platinrhodanid-Reaktion mit den Blüten von Colchicum alpinum, arenarium, montanum und Gloriosa superba.

Sie erhielten ferner typische Colchicinreaktionen mit Phosphormolybdänsäure und Platinrhodanid mit konzentrierten Extrakten aus den Blüten von Bulbocodium ruthenicum und vernum, Tofieldia glacialis und calyculata, Blüten, Blättern, Wurzel und Samen von Veratrum album, nigrum und viride, den ganzen Pflanzen von Anthericum ramosum, Hemerocallis fulva, Ornithogalum umbellatum und comosum, Tulipa silvestris; Spuren fanden sich noch in Asphodelus albus, Fritillaria montana, Lloydia serotina und Muscari tenuiflorum. Sie glauben damit die Gegenwart von Colchicin in diesen Pflanzen sehr wahrscheinlich gemacht zu haben.

Herrmann[3]) erhielt mit Ammoniak in den Alkaloidzellen eine intensive Gelbfärbung. Lindt[4]) findet im Siebteil der Zwiebelschuppen mit Schwefelsäure-Salpetersäure Colchicinreaktion (violettrote Färbung).

[1]) G. Klein u. G. Pollauf, Der Nachweis des Colchicins, Österr. botan. Zeitschr., 1929, LXXVIII, S. 251.

[2]) J. Burmann, Schw. Wchschr. f. Chem. u. Pharmaz., 1911, XLIX, S. 6.

[3]) O. Herrmann, Nachweis einiger organischer Verbindungen in den vegetabilischen Geweben, Dissertation, Leipzig 1876, S. 18.

[4]) O. Lindt, Über den mikrochem. Nachweis von Brucin und Strychnin, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, S. 237.

Da die Reaktion an mit Petroleumäther entfetteten Schnitten ausbleibt, so soll die Färbung dem Fette zukommen. Wir wissen aber jetzt durch die makrochemischen Untersuchungen von Dragendorff, C. C. Keller u. a., daß bei der Extraktion mit Petroleumäther zugleich mit dem fetten Öle größere oder kleinere Anteile an Alkaloiden den Präparaten entzogen werden. Maistriau[1]) erhielt mit Salzsäure oder mit schwach verdünnter Schwefelsäure (1 Teil Säure + 2—3 Teile Wasser) eine gelbe Farbenreaktion. mit konzentrierter Schwefelsäure, der auf 5 Tropfen 1 Tropfen Salpetersäure zugesetzt ist (oder mit Schwefelsäure, die einige Kristalle Kaliumnitrat enthält — die genaue Zusammensetzung ist im Original nicht angegeben) eine anfangs violette, dann braune Färbung. Jodjodkalium gibt einen kermesbraunen körnigen Niederschlag, der beim Erwärmen nicht verschwindet, aber nach längerer Zeit selbst in der Kälte sich auflöst. Der Niederschlag erscheint körniger, wenn die Präparate zuvor mit Salzsäure oder Schwefelsäure betupft werden. Jodquecksilberjodkalium bewirkt nach vorangegangener Ansäuerung mit Salzsäure einen chromgelben Niederschlag. Im Gegensatz zu Barth (s. unten) soll Tannin keine guten Resultate und Pikrinsäure überhaupt keine Reaktion geben. Die Unstimmigkeit ist erklärlich. Maistriau ließ die Reagentien unter Deckglas auf die Präparate einwirken, Barth legte größere Gewebestücke 8 Tage in die betreffenden Lösungen ein und stellte nach oberflächlichem Abspülen mit Wasser aus ihnen erst die Präparate her. Nachprüfungen bestätigen die Angaben Barths hinsichtlich der Pikrinsäure. Die Tanninreaktion zeigte sich aber zu unklar.

Kürzere Mitteilungen liegen von Rosoll[2]) und Paschkis[3]) vor. Letzterer gibt an, daß sich Präparate aus Knollen und Samen „mit Salzsäure und unterchlorsaurem Natron“ rosenrot färben. Nach einiger Zeit soll ein körniger Niederschlag entstehen. Bei Nachprüfungen erwies sich das Reagens in Knollen und Samen als unbrauchbar. Die eintretende Färbung (dunkelgelb) ist wahrscheinlich nur durch die Salzsäure bedingt. Erst Barth (Lit. S. 439, 6) kontrolliert die Reaktionen an —Schnitten, zu deren Herstellung Weinsäure-Alkohol benutzt wird. Bei lebendem Material (Knollen, Blätter) entfernt man die Alkaloide schneller durch heißen Alkohol (mehrere Minuten). Blau[4]) geht nur

---

[1]) Maistriau in: Errera, Maistriau, Clautriau, Prem. rech. s. l. localisat. et signif. des Alcaloides d. l. pl., Bruxelles. Sep. 1887, S. 8—12.

[2]) A. Rosoll, Über den mikrochem. Nachw. d. Glykoside u. Alkaloide in den vegetab. Geweben, Jahresber. d. Realgymnas. zu Stockerau, 1889—90.

[3]) Paschkis, Realenzykl. d. ges. Pharm., I. Aufl., III, S. 212.

[4]) H. Blau, Der Colchicingehalt der Herbstzeitlosensamen, Zeitschr. allg. österr. Apoth.-Vereins, 1903, XLVII, S. 1067.

auf den Nachweis im Samen ein, wobei er dünne Schnitte verwendet, die er erst mit konzentrierter Salpetersäure, dann mit Wasser und endlich mit Natronlauge behandelt und dadurch eine anfangs dunkelviolette, dann gelbe und schließlich ziegelrote Färbung erzielt. Der braune Farbstoff der Samenschale wurde zuvor entfernt durch kurze Mazeration der Präparate in Äther (s. oben). Rosenthaler und Mosimann verwendeten Brombromkalium und Silikowolframsäure, Niethammer benützte Reineckes Salz (s. S. 433) und will damit schwarze Kristallnadeln erhalten haben.

Über die Lokalisation des Colchicins läßt sich aus den Angaben der Literatur und eigenen Untersuchungen folgendes Bild gewinnen:

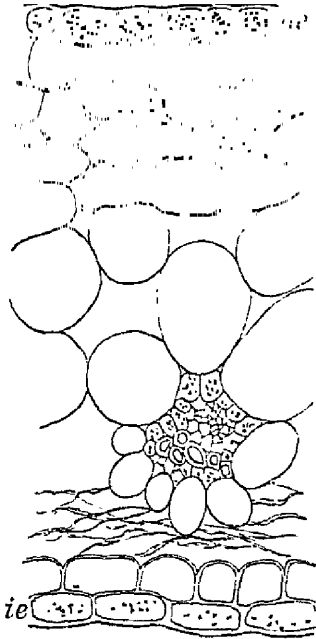



Fig. 102. Colchicum autumnale, Fruchtwand, Querschnitt (nicht ganz reife Kapsel). Alkaloidfällung mit Brombromkalium (*ae* = äußere, *ie* = innere Epidermis) (Tunmann)

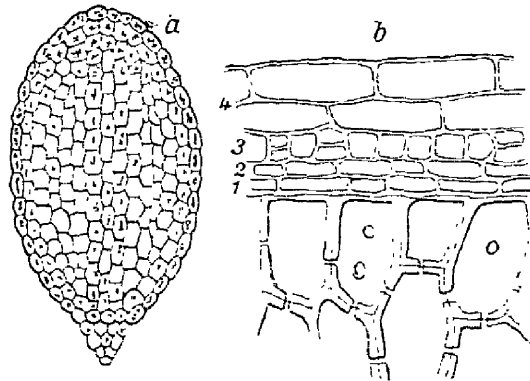



Fig. 103. Colchicum autumnale; *a*) isolierter Embryo, Alkaloidfällung (mit Jodjodkalium); *b*) Samenschale (fast reifer Same), die Schichten 1 und 2 führen die Hauptmengen Colchicin (Tunmann)

Knolle: In der äußeren Epidermis der weißen Schuppe und in der Gefäßbündelscheide, nach Goris auch in der Epidermis der Knolle selbst. Barth erhielt mit Pikrinsäure noch im Phloem einen Niederschlag und beobachtete außerdem, daß in der Vegetationsspitze und unterhalb dieser das Alkaloid ziemlich gleichmäßig in allen Zellen auftritt. In den Knollen des Vorjahrs ist nur noch wenig Alkaloid vorhanden.

Stengel: In Epidermis und Gefäßbündelscheide.

Blatt: Epidermis und Bündelscheiden der Nerven; auch in vereinzelten Zellen des Mesophylls.

Frucht: In der Epidermis der Fruchtschale.

Über die Lokalisation im Samen bestehen Differenzen; die Hauptmenge findet sich jedenfalls in den beiden inneren Zellreihen der Samenschale (Fig. 103) und zwar im reifen Samen.

Nach Maistriau und Albo[1]) ist das Endosperm alkaloidhaltig, ein Befund, der allgemein in die botanische Literatur übergegangen ist, nach Herrmann die Samenschale, während sich „im Endosperm nur in dickeren Schnitten Spuren" finden. *Zu dem gleichen Ergebnis kam* Barth auf entwicklungsgeschichtlichem Wege. Colchicin ist im unreifen Samen „in der aus quadratischen Zellen bestehenden Schicht, die auf der Seite, wo die Caruncula ansetzt, 2—3reihig ist", im reifen Samen vorzüglich in der Samenschale, in kleinen Mengen in den „Öl-

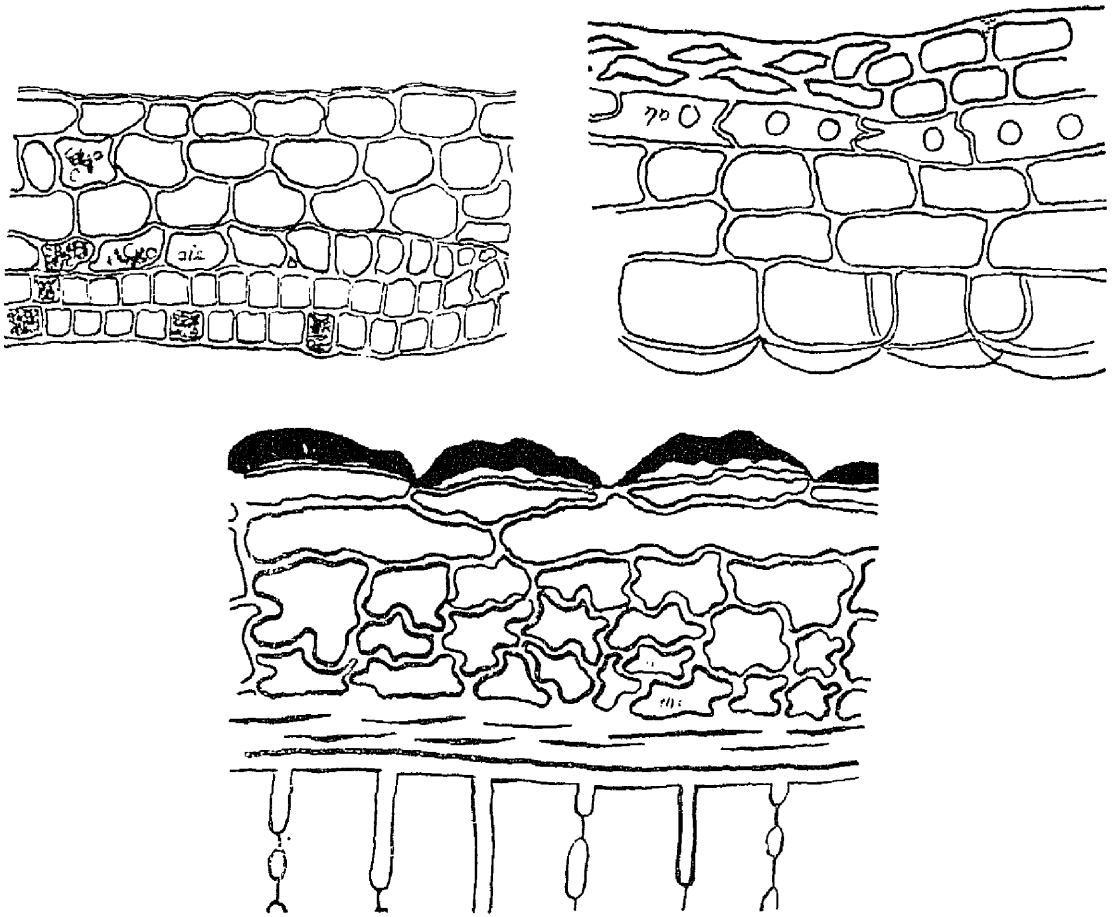



Fig. 104. [illegible] Samens von Colchicum autumnale [illegible] Schichten (Grogg)

tropfen im Endosperm und reifen Embryo". Blau fand es nur in der Schale (reifer Samen) und nur in den „beiden innersten direkt an das Endosperm grenzenden und mit diesem verwachsenen, tangential gestreckten Zellreihen (Pigmentschicht)". Nach Tunmanns Befunden enthält der reife Embryo Alkaloid (Fig. 103). Übrigens ist die Meinung der Chemiker in dieser Frage ebenfalls geteilt. Während Hübler (1865),

[1]) G. Albo, Sur la signification physiologique d. la Colchicine dans les différentes espèces de Colchicum et de Merendera. Arch. Sciences phys. et nat. 1901, XII, S. 10.

Kremel, Zeisel u. a. nur die Samenschale als alkaloidhaltig bezeichnen und Blau im isolierten Endosperm keine Spur von Alkaloid makrochemisch nachweisen konnte, finden andere Autoren auch im Endosperm Alkaloide. Rosenthaler und Mosimann fanden mikrochemisch im Endosperm kein Alkaloid und stellten weiter fest, daß im Knollen, dem jungen Blatt und der Samenschale die Alkaloidzellen Tannid enthalten.

Lipták[1]) verwendet neben allgemeinen Fällungsmitteln Froehdes Reagens, Schwefelsäure + Kaliumnitrat, Vanadin-Schwefelsäure und Erdmanns Reagens und findet damit Alkaloid außer in der dritten Schicht der Samenschale auch im Endosperm, da die Reaktionen auch noch bei den mit Äther aber nicht in den mit Wasser und Weingeist behandelten eintraten.

O. Grogg[2]), der die Alkaloidbildung entwicklungsgeschichtlich verfolgte (Fig. 104) und Jodjodkalium als das beste Reagens erklärt, fand, daß die Hauptmenge der Alkaloide in der Nährschicht der Samenschale und zwar in den inneren Zellschichten des äußeren Integumentes ist. Ein Wechsel in der Lokalisation scheint im Laufe der Entwicklung des Samens nur insoweit einzutreten, als es das Zusammenfallen der Samenschale mit zunehmender Reife mit sich bringt. Nach Grogg enthalten auch das Endosperm und der Keimling in beschränktem Maße Alkaloide. Der Alkaloidgehalt nimmt mit fortschreitender Entwicklung zu, während Eiweiß und Stärke in gleichem Maße aus der Nährschicht verschwinden.

Fritillaria imperialis

In den unterirdischen Teilen von Fritillaria imperialis entdeckte Fragner 1888 ein Alkaloid, Imperialin (bis 0,12 %), welches farblose Nadeln bildet, die sich in Alkohol und Chloroform leicht lösen, in Wasser aber unlöslich sind.

Die Mikrochemie bedarf noch weiterer Bearbeitung. Villani[3]) hat +- und —Schnitte mit Jodjodkalium untersucht und fand die Base in der Wurzel vorzüglich im Pericambium und in der Endodermis, dann in der Epidermis und im Grundparenchym. Das Alkaloid soll in der Wurzel nur zum Teil im Zellsaft gelöst sein, zum Teil soll es besondere Körnchen bilden; in der Epidermis der Zwiebel soll es in Bläschen enthalten sein, die eine Haut besitzen, oft feinkörnig aussehen und in Wasser unlöslich sind. Es ist etwas gewagt, Körnchen und Bläschen deshalb als Alkaloide anzusprechen, weil sie sich in Weinsäure-Alkohol lösen.

[1]) P. Lipták, Über die Lokalisation des Alkaloides in den Samen von Colchicum autumnale L. Referat Zeitschr. wiss. Mikroskop., 1928, XLV, S. 405.

[2]) O. Grogg, Über das Vorkommen von Alkaloiden in der Nährschicht der Samenschalen, Inaug.-Diss. Bern, 1921.

[3]) A. Villani, Sulla localisazione dell' alcaloide nella Fritillaria imperialis, Malpighia, 1901, XV, S. 9.

Über die Alkaloide von Frit. verticillata var. Thumb. fehlen phytomikro-chemische Angaben.

Sabadilla officinarum

Im Samen von Sabadilla officinarum Brandt wurden Alkaloide (Veratrin) 1818 von Meissner ermittelt. Das Veratrin der älteren Autoren war ein Gemisch mehrerer Basen, das jetzt im Handel befindliche besteht aus drei Alkaloiden (kristallisiertem Veratrin, amorphem Veratridin und Cevadin). Doch kommen noch mehrere, wenig erforschte Basen vor (Gesamtgehalt 0,6—0,7 %).

In Blatt, Blüten, Zwiebel und Wurzeln fanden G. Klein und seine Mitarbeiter[1]) keine Basen.

Veratrin. Amorphes weißes bei 150—155° schmelzendes Pulver, schwer in Wasser, leicht in Weingeist löslich. Mikrosublimation im Glasring mit Deckglas ergibt Veratrumsäure (s. S. 242). Erhitzt man Veratrin mit konzentrierter weingeistiger Kalilauge zum Sieden, so scheidet sich Cevin-Kalium in Nadeln und Plättchen aus; aus dem Filtrat lassen sich Angelika- und Tiglinsäure (Mischmikroschmelzpunkt ungefähr 55°) gewinnen.

Cevadin F. 207,5°. Verhält sich bei der Verseifung mit weingeistiger Kalilauge wie Veratrin. Mikrosublimation ergibt nach Befeuchtung mit Phosphorsäure ein kristallinisches Sublimat von Veratrumsäure.

Der mikrochemische Nachweis der Basen kann nach G. Klein und seinen Mitarbeitern[1]) folgendermaßen erfolgen: 0,1 g gepulverter Sabadillsamen wird mit 96proz. Weingeist ausgezogen, dieser entweder freiwillig verdunstet oder im Vakuum entfernt. Mit dem Rückstand werden folgende Reaktionen angestellt: 1. Ein Teil des Rückstands wird (eventuell mit einem Tropfen Phosphorsäure) im Glasring sublimiert. Kriställchen von Veratrumsäure. Reaktionen s. S. 242). 2. Ein zweiter Teil wird am Objektträger mit einem Tropfen heiß gesättigter weingeistiger Kalilauge über kleiner Flamme bis zur Blasenbildung erhitzt. Beim Erkalten fällt Cevinkalium (s. oben) aus. 3. Ein dritter Teil wird mit einem Überschuß der weingeistigen Lauge am Mikrorückflußkühler 20 Minuten im Sieden erhalten. Nach dem Abkühlen wird mit Phosphorsäure angesäuert und im Mikrodestillationsapparat destilliert. Das Destillat, das die schon am Geruch zu erkennende Angelika- und Tiglinsäure enthält, wird entweder im Vakuum-Exsikkator eingetrocknet oder ausgeäthert. Die Prismen und Nadeln des Rückstands geben mit dem Wernerschen Kupferreagens[2]) blaugrüne Prismen und Drusen.

[1]) G. Klein, E. Herndlhofer u. O. Tröthandl, Der mikrochemische Nachweis der Sabadilla-Alkaloide, Österr. bot. Zeitschr., 1928, LXXVII, S. 111.

[2]) 0,5 g Kuprichlorid wird in 20 ccm Methanol gelöst; zu der mit 20 ccm Glyzerin versetzten Flüssigkeit wird so lange Ammoniak zugesetzt, bis nach gutem Umschütteln die Flüssigkeit eben noch trübe ist.

Zum Nachweis der Alkaloide im Sabadillsamen lassen sich (Barth, S. 36 der auf S. 439 gen. Dissert.) eine große Anzahl Reagentien mit gutem Erfolg verwenden. Jodjodkalium, Kaliumwismutjodid (brauner Niederschlag), Pikrinsäure (gelber Niederschlag), Salzsäure (rote Färbung), Vanadin- und Selenschwefelsäure (braun — rot — violett), Schwefelsäure (grünblau — gelborange — rot), Salpetersäure (Gelbfärbung, bei Wasserzusatz nach einigen Stunden kristallinische Fällung), Kaliumquecksilberjodid (starke Fällung, nach Auswaschen des überschüssigen Reagens mit Wasser und nachfolgendem Schwefelsäurezusatz (2 : 1) entstehen in den Endospermzellen rote quadratische Kristalle, nicht in der Samenschale). Bei der Nachprüfung erwies sich diese Reaktion recht launenhaft, meist konnte Tunmann aus unbekannten Gründen keine Kristalle erhalten. Die Fettmassen stören die Beobachtung. Bei der Salpetersäure-Reaktion fanden sich die feinen, lebhaft polarisierenden Kristalle fast ausschließlich in den Fettmassen (Fig. 105), so daß der Befund weiter verfolgt werden muß; die Natur dieser Kristalle erscheint noch nicht sichergestellt. Zuweilen wird der ganze Tropfen kristallinisch. Bei durch Weinsäure-Alkohol alkaloidfrei gemachten Präparaten bleiben die genannten Reaktionen aus.

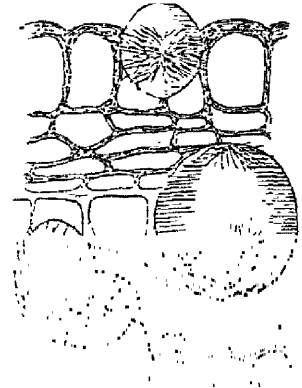



Fig. 105. Sabadilla officinarum (Same, Querschnitt). Kristalle (Alkaloide?) mit Salpetersäure-Wasser (Tunmann)

Die Alkaloide kommen ganz überwiegend im Endosperm und im Embryo vor. In der Samenschale treten weniger Alkaloide auf, immerhin deuten Kaliumquecksilberjodid und Jodjodkalium auch dort auf Alkaloide. Veratrin tritt nur im Endosperm und im Embryo auf.

Goris erhielt mit Cer-Schwefelsäure ($H_2SO_4 + H_2O$) im Keimling und Endosperm (besonders in dessen Mitte) eine Rosafärbung. L. Rosenthaler und M. Mosimann erhielten mit Brombromkalium oder Silikowolframsäure in den Endospermzellen aber nicht in der Samenschale starke Niederschläge. Die Alkaloide sind nicht von Tannid begleitet.

O. Grogg glaubt Alkaloide in der Nährschicht der Samenschale nachgewiesen zu haben.

Veratrum

Veratrum album führt mehrere Basen (Protoveratrin, Jervin, Pseudojervin, Rubijervin, Salzberger[1])), die in geringerer Menge ebenfalls in Veratrum viride auftreten und zum Teil in V. lobelianum und nigrum vorkommen. Sie werden von

[1] G. Salzberger, Arch. d. Pharm., 1890, CCXXVIII, S. 462.

Veratridin, einer amorphen, noch wenig erforschten Base, begleitet, die sich mit konz. Salzsäure rot färbt. Im Rhizom von V. album gibt Kremel 1,3—1,5 %, Bredemann[1]) nur 0,199—0,932 % Gesamtalkaloid an.

Zum Nachweis zog Borscow[2]) verdünnte Schwefelsäure (1 Tropfen englische Schwefelsäure + 2 Tropfen Wasser) heran, welche die Alkaloide erst gelb, dann rotorange, schließlich schmutzig violettrot färbt. An dieser Färbung nehmen sämtliche Veratrumalkaloide teil. Später hat Rundquist[3]) konzentrierte Lösungen von Phosphorwolframsäure und Ammoniummolybdat benutzt, die gut sichtbare Niederschläge geben. Beim Nachweis minimer Mengen „empfiehlt es sich, die Schnittfläche der Präparate mit konzentrierter Salzsäure zu befeuchten und schwach zu erwärmen, wodurch das Alkaloid lebhaft rot gefärbt wird".

Borscow fand die Alkaloide in der Wurzel vornehmlich im Inhalte der Parenchymzellen, in einzelnen Zellen des Kambiforms, besonders aber in der Epidermis und in der Bündelscheide. Doch sollten nach ihm die Alkaloide, wenn auch in geringer Menge, ebenfalls in der Membran vorkommen, ein Irrtum, den Errera[4]) bereits richtigstellte und der leicht erfolgt, wenn man Säuren durchsaugt. Reaktionen werden von Errera nicht angegeben. Rundquist hingegen hält die Endodermis für alkaloidfrei und verlegt den Sitz in das stärkehaltige Parenchym. Größere Mengen führen die älteren Teile der Wurzel, während sich in jüngeren Teilen eine Abnahme bemerkbar macht und die Wurzelspitze ganz alkaloidfrei sein soll. Der Stengel zeigt die gleiche Lokalisation, führt aber weniger Alkaloid.

Goris, der außer Dragendorffs Reagens Schwefelsäure ($+H_2O$) verwendet, die Cersulfat oder selenige Säure enthält — beide Reagentien rufen Rosafärbung hervor — findet, daß die Alkaloide sich in Rhizom und Wurzeln in den äußeren Teilen der Rinde — mit Ausnahme der äußersten Schicht — befinden. In den blattartigen Häuten sind sie im Zellsaft der Epidermiszellen besonders in der äußeren Epidermis.

L. Rosenthaler und M. Mosimann fanden, daß mit säurehaltigem Brombromkalium in allen Parenchymzellen des Rhizoms und der Wurzel Niederschläge entstanden, mit demselben Reagens ließen sich Alkaloide in der Epidermis der Blätter, namentlich den Schließzellen der Spaltöffnun-

[1]) G. Bredemann, Über die Alkaloide von Veratrum album und über die quantitative Bestimmung derselben, Apoth.-Ztg., 1906, XXI, S. 41.

[2]) El. Borscow, Über die Verbreitung einiger organischer Verbindungen in den Gewebselementen des Pflanzenkörpers, Bot. Ztg., 1874, XXXII, S. 38.

[3]) C. Rundquist, Über den Sitz und die Verteilung der Alkaloide in Veratrum album, Pharm. Post, 1901, XXXIV, S. 117.

[4]) L. Errera, in: Prem. rech. s. l. localisat. et signif. des alcaloides d. l. plant., Bruxelles, 1887, Sep. S. 24.

gen und den meisten Parenchymzellen nachweisen. Sie finden sich hier mit einem Tannid zusammen, während Rhizom und Wurzel davon frei sind.

In den Samen von Veratrum album findet O. Grogg (l. c. S. 445) mit Hilfe von Kaliumwismutjodid, Mayers Reagens, Brombromkalium, Chlorzinkjod und Millons Reagens, daß die Samenschale Alkaloide enthält und zwar hauptsächlich in der Nährschicht; auch Epidermis und Endosperm scheinen geringe Mengen von Alkaloiden zu enthalten.

Amaryllidaceae

Narcissus

In Narcissus rugulosus, N. pseudonarcissus, N. incomparabilis, N. tazetta, N. poeticus treten wenig erforschte Alkaloide auf. Gerrard fand 1877 in N. pseudonarcissus (Zwiebel) das Pseudonarcissin, de Wèvre[1]) untersuchte N. rugulosus, Yamanchi (1892) N. tazetta (Blätter und Zwiebeln) und Ewins[2]) studierte das Narcissin näher, das sich leicht in Wasser, Weingeist und Essigsäure löst und brecherregend wirkt (Jourdain, 1872). Errera beobachtete nach Verdunkelung (2 Wochen) im Stengel keine Abnahme der Alkaloide. Ein Alkaloid aus Narcissus tazetta L. ist nach Yamanchi identisch mit dem Lycorin aus Lycoris radiata Herb.

Zum mikrochemischen Nachweis eignet sich am besten N. rugulosus und über diese Pflanze liegen Erfahrungen von Errera (S. 19 der auf S. 442 angef. Lit.) vor. Benutzt wurden zum Nachweis: Jodjodkalium (rotbrauner, in unterschwefligsaurem Natron sich lösender, körniger Niederschlag), Quecksilberkaliumjodid (weißliche, in Salzsäure unlösliche Fällung). Geringe, wenig auffallende Fällungen geben Tannin, Phosphormolybdänsäure, Pikrinsäure. Konzentrierte Schwefelsäure färbt die alkaloidhaltigen Zellen der Präparate lebenden Materials, die trocken unter Deckglas liegen, intensiv grünblau.

Alkaloidhaltig sind in der Wurzel: Endodermis und benachbartes Rindenparenchym, sowie zerstreute Zellen des Rindenparenchyms, das hypodermale Gewebe und die Geleitzellen der Siebröhren; im Stengel sind Alkaloide in den Raphidenzellen, in der Epidermis, in den Geleitzellen, in der Nähe der Gefäße und zuweilen in zentralen Zellen des Grundgewebes. Der Nachweis im Stengel ist schwierig, weil der Zellsaft bei der geringsten Verletzung austritt. Man muß die Präparate mit einem mit Jodjodkaliumlösung befeuchtetem Messer anfertigen, wodurch der Zellsaft sofort fixiert und an dem Austreten verhindert

[1]) A. de Wèvre, Sur l'alcaloide des Narcisses, Bull. soc. belg. Microsc., 1886, XIII, S. 137.

[2]) A. J. Ewins, Narcissin, ein Alkaloid aus dem gemeinen Affodill (N. pseudonarcissus), Trans. Chem. Soc., 1910, XCVII, S. 2406.

wird. — Interessant ist das Vorkommen der Alkaloide in den Raphidenzellen, ein Befund, der von Comotti[1]) bestätigt wurde.

Clivia

Die Base von Clivia miniata Benth. (Cliviin) ist makrochemisch noch nicht studiert. Sie wurde von Molle[2]) bei mikrochemischen Studien aufgefunden. Zum Nachweis im ausgeflossenen Zellsaft dienen: Jodjodkalium (brauner N.), Kaliumquecksilberjodid (hellgelber, käsig zusammenballender N.), Phosphormolybdänsäure (gelber N., mit Ammoniak blau werdend), Goldchlorid (graugelber N., sich bald reduzierend), Tannin (weißer N.), konzentrierte Pikrinsäurelösung (gelbkörniger N., der sich in der Wärme löst und beim Erkalten wieder ausscheidet). Zum Nachweis in der Zelle sind am besten geeignet: Jodjodkalium, Goldchlorid (dieser Niederschlag kann nach der Strasburgerschen Methode für Aleuronfärbung — s. d. — für Dauerpräparate haltbar gemacht werden), Pikrinsäure. Schwefelsäure färbt mit Ammoniumvanadanat grün, mit Kaliumdichromat blau (zur Lokalisationsermittlung nicht geeignet). Die Lokalisation ist die gleiche wie bei Narcissus, stark alkaloidhaltig sind auch hier die Raphidenzellen.

Die Lokalisation der Alkaloide ist von Comotti auch noch in anderen Amaryllidaceen untersucht worden, so in Galanthus nivalis L., Leucojum aestivum L. und vernum L., Amaryllis Belladonna L., der alkaloidreichsten, Eucharis amaronica Hort. Linden, Hymenocallis adnata W. Herb., Pancratium maritimum L., Pancratium illyricum L., Sternbergia lutea Ker. Gawl., Hippeastrum vittatum L., Sprekelia formosissima L., Crinum americanum L., Haemanthus punicus L. und Haemanthus coccineus L. Die Alkaloide finden sich in den Raphidenzellen; nach diesen am meisten in den Epidermiszellen; sie können weiterhin vorkommen in der Nähe der Gefäßbündel, besonders in der Endodermis und im Siebparenchym der Bündel. In der vollkommen entwickelten Wurzel findet sich Alkaloid außer in den Raphidenzellen in der Endodermis.

Orchidaceae

Die Orchideen-Alkaloide sind chemisch nicht näher erforscht. Wildeman[3]) suchte ihre Lokalisation mit Jodjodkalium an +- und —.

---

[1]) R. Comotti, Unters. über die Lokalisation der Alkaloide in den Amaryllidaceen, Thèse, Paris 1910.

[2]) P. Molle, Un alcaloide dans Clivia miniata Benth., Rec. d. l'Inst. Errera, Bruxelles, 1906, VI, S. 57.

[3]) E. de Wildeman, Présence et localisation d'un alcaloide d. quelq. orchidées, Bull. soc. belg. microsc., 1892, XVIII, S. 101. Die Angabe der Literatur

Schnitten zu ermitteln; außerdem fanden Anwendung Phosphormolybdänsäure (gelber Niederschlag, besonders nach Zusatz einer Spur Salpetersäure), Froehdes Reagens (gelbe Färbung), Schwefelsäure (färbt die Alkaloidvakuolen gelb, die Reaktion gelingt nicht immer), Jodjodkalium, mit Ammoniumkarbonat versetzt, sowie Kaliumwismutjodid (braune Fällungen). Die Basen finden sich in den peripheren Teilen (Epidermis und Trichome), in meristematischen Geweben und im Parenchym der Luftwurzeln, Blättern und Blüten von Dendrobium nobile und Ainsworthii sowie in dei Luftwurzel von Phalaenopsis Lüddemanniana. Aus D. nobile (Stengel) hat Clautriau ein Alkaloid isoliert, ein kristallinisches Sulfat, das ähnliche Reaktionen gibt, die naturgemäß stärker ausfallen. Die Raphidenzellen von Dendrobium sollen alkaloidfrei sein.

In ähnlicher Weise wies de Droog[1]) Alkaloide mikrochemisch nach in Eria stellata, Catasetum tabulare[2]), C. Hookeri, C. macrocarpum. C. discolor und C. Bungerothii.

In Chysis bractescens, Phalaenopsis Lüdemannia und Phalaenopsis amabilis hat Wester[3]) die Lokalisation der Alkaloide mit Jodlösung studiert. Chysis bractescens: Wenige Parenchymzellen der Hauptnerven des Blattes reagieren schwach auf Alkaloide. Phalaenopsis Lüdemannia: In einigen Zellen des Rindenparenchyms der Luftwurzel. Phalaenopsis amabilis: In fast allen Parenchymzellen der Luftwurzel (mit Ausnahme der äußersten Zellschichten des Velamens und des Marks), ferner in Blatt, Blüte und Blütenstiel.

Dicotyledonen

Piperaceae

Piper

Piperin (Oerstedt 1819) bildet monokline Prismen F. 128°. Kaum löslich in Wasser, leichter in Weingeist, Chloroform, Benzol und Äther. Wird durch Kalilauge in Piperidin und Piperinsäure gespalten.

(Jahresber. d. Pharm. u. a.), daß W. Kristalloide (Eiweiß) als Alkaloidsalze angesprochen hat, ist falsch.

[1]) E. de Droog, Contr. a l'étude de la localisation microch. des alcal. dans la famille des orchidacées, Mém. Ac. royale de Belg., 1896, LV, Rec. Inst. bot. Bruxelles 1906, II, S. 347.

[2]) Die Alkaloide der Catasetum-Arten geben mit Goldchlorid farblose Sphärite.

[3]) D. H. Wester-Haag, Mikrochemische Untersuchung einiger gezüchteter Orchideae auf Alkaloid und Gerbstoffe, Ber. deutsch. pharmazeut. Gesellsch., 1921, XXXI, S. 179.

Piperin ist bisher nur in den Früchten von Piperaceen nachgewiesen, so in den reifen und unreifen von Piper nigrum (6—9, selten bis 13 %), in denen von P. guineense Schum.. P. lowong Blume (Stenhouse) und P. Clusii (bis 5 % Herlant). In vegetativen Teilen verschiedener Piperaceen konnten Klein u. Krisch[1]) Piperin nicht nachweisen.

Zum Piperinnachweis brachte Molisch die Präparate (P. nigrum) unter Deckglas in absoluten Alkohol und ließ nach dem teilweisen Verdunsten desselben Wasser zutreten. Hierbei entsteht zunächst eine milchige Trübung, die von harzigen Ausscheidungen herrührt; nach ¼—½ Stunde scheiden sich nahe dem Deckglasrande Piperinkristalle ab. Piperinkristalle sollen auch in der gleichen Zeit entstehen, wenn man die Präparate unter dem Deckglas in Wasser zerdrückt und zerreibt und das Öl verdunsten läßt, sowie nach längerer Zeit (mehrere Stunden), wenn man zarte Schnitte in Wasser oder Glyzerin in der feuchten Kammer liegen läßt. Hierbei entstehen die Kristalle zuweilen (nicht immer) in den Ölzellen (Fig. 105b). Im Pfefferpulver des Handels trifft man ebenfalls Piperinkriställchen öfters an. Sehr schnell erhält man Kristalle bei Zusatz von Ammoniak (Fig. 105c). Der Literatur zufolge soll die Alkoholmethode bisweilen versagen. Tunmann gab sie stets schöne Erfolge. Doch ist es nötig das polarisierte Licht zur Auffindung zu benutzen. Die durch Alkohol abgeschiedenen Kristalle fand Zimmermann (Mikrotechnik,) vorwiegend in säbelförmiger Gestalt und einzeln liegend. Bei den Nachprüfungen wurden nur Kristallgruppen erhalten. Die größten, flachen Prismen waren bis 55 μ lang und 5—8 μ breit und stets eingefaßt von kleinen Kristallen (Fig. 105a). Die Piperinkristalle polarisieren lebhaft (vorwiegend in gelb) und zeigen eine unebene Oberfläche.

Fig. 105. Piper nigrum, Piperinkristalle, a) mit Alkohol aus dem Handelspulver erhalten, b) mit Glyzerin im Schnitte, c) mit Ammoniak im Pulver (Tunmann)

Man kann das Piperin auch mit Chloroform-Azeton zur Abscheidung bringen. Mehrere Präparate kommen unter Deckglas in Chloroform. Das verdunstende Chloroform wird einmal erneuert und das Deckglas hierbei gedrückt. Vor völliger Verdunstung des Chloroforms wird Azeton zugefügt; man läßt das Präparat über Nacht liegen.

[1]) G. Klein u. M. Krisch, Der Nachweis des Piperins und seiner Spaltungsprodukte Piperidin und Piperinsäure, Österr. bot. Zeitschr., 1929, LXXVIII, S. 257.

Dem dann eingetrockneten Präparate wird Wasser oder Glyzerin zugefügt. Am Deckglasrande, doch über den Präparaten zeigen sich nun große und gut ausgebildete Prismen und Täfelchen, oft zu Drusen vereinigt.

Setzt man zu Pfefferpulver (oder einem Schnitt) unter dem Deckglas seitwärts Essigäther und mischt durch einmaliges einseitiges Heben des Deckglases, so entsteht bald eine gelbe, Piperinkristalle enthaltende Zone. Die Kristalle, vielfach in Warzen, werden bis 300 μ lang und sind im Mittel 150—250 μ lang und etwa 40 μ breit. Sie sind monoklin[1]).

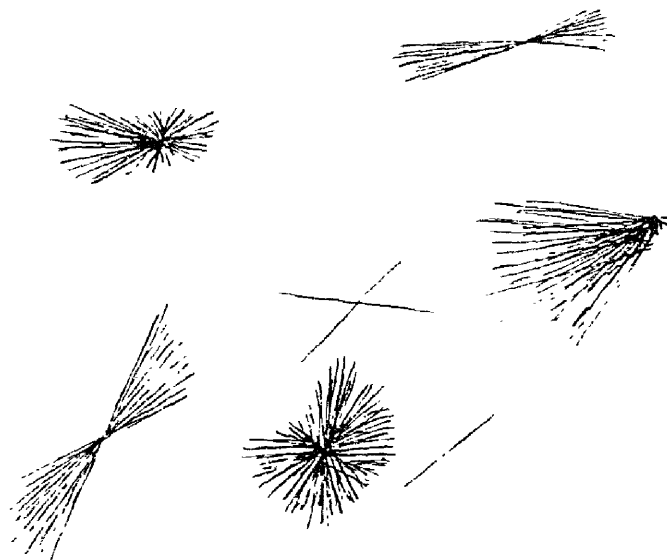



Fig. 106. Piperin-Cadmium-Verbindung aus schwarzem Pfeffer

Gleichgültig, welches Lösungsmittel man zur Extraktion des Piperins benutzt (ich selbst wandte Chloroform an) muß man die entstandenen Kristalle oder die amorphe das Piperin enthaltende Zone noch mit einem charakteristischen Reagens für Piperin behandeln. Man verreibt mit konzentrierter Salzsäure und bringt in die Flüssigkeit einige Kriställchen Kadmiumazetat (oder Sulfat). Es treten dann bald die gelben Nadeln (isoliert, in Garben oder Büscheln) der Piperin-Kadmiumverbindung aut (Fig. 106). Man erhält sie noch einfacher dadurch, daß man ein wenig Pfefferpulver mit Salzsäure verrührt und dazu das Kadmiumsalz gibt (Rosenthaler)[2]).

Durch Mikrosublimation im Mikrosublimationsapparat nach Klein und Werner und Überführung des Sublimats in die Kadmiumverbindung konnten Klein und Krisch Piperin noch in 1 mg Pfefferpulver nach-

---

[1]) O. Tunmann, Der Piperinnachweis bei der Erkennung des Pfefferpulvers, Apoth.-Ztg., 1918, XXXIII, S. 353.

[2]) L. Rosenthaler, Chemische Charakterisierung von Drogen, Pharm. Act. Helv., 1926, I, S. 72.

weisen. Weniger empfindlich (0,01 g Pfefferpulver) wird der Nachweis durch Extraktion mit ammoniakalischem Chloroform oder mit Weingeist im Mikroextraktionsapparat nach Klein.

Außer dem Nachweis über die Kadmiumverbindung verwandten Klein und Krisch auch noch den durch die Spaltungsprodukte des Piperidins (Piperidin und Piperinsäure). Näheres darüber siehe in der Originalabhandlung.

Wagenaar[1]) kristallisiert das Piperin aus 30proz. Essigsäure und erhält so scharf auslöschende Prismen. Auslöschungswinkel 37°, ähnlich auch aus Azeton.

Nymphaeaceae

Das 1883 von Grüning im Rhizom von Nuphar luteum und Nymphaea alba entdeckte, amorphe Nupharin ist wenig erforscht. Pizzeti[2]), die vorzüglich Jodjodkalium zum Nachweis heranzog (Nuphar rotbraune, Nymphaea hellrote Färbung, die nach einiger Zeit schwindet), fand, daß die Lokalisation in beiden Pflanzen nahezu übereinstimmt. Alle Teile mit Ausnahme der Samen sind alkaloidhaltig.

Die Lokalisation ist in den beiden Pflanzen die folgende:

Rhizom: In zahlreichen subepidermalen Zellen, in den Zellen des Lückengewebes, im Siebteil und der nächsten Umgebung der Gefäßbündel.

Wurzel: Bei Nuphar luteum: In Zellen des Lückengewebes, in der innerhalb der Endodermis gelegenen Schicht, im Siebteil, in den den Gefäßen anliegenden Parenchymzellen und dem Mark. Bei Nymphaea alba hauptsächlich im Rindenparenchym.

Blatt: Im Lückengewebe und den Gefäßbündeln analog dem Rhizom.

Blüte: Bei Nymphaea alba: In der Basis des Blütenstiels im Parenchym, Lückengewebe und den die Gefäßbündel umgebenden Zellen. Bei Nuphar luteum: Ein wenig in der Epidermis und darunter gelegenen Zellen, in einigen Zellen des Parenchyms und der Gefäßbündel. Blumenblätter: Bei beiden Pflanzen in der äußeren Schicht des Mesophylls. Kelchblätter: Bei Nymphaea alba in der oberen Epidermis und darunter gelegenen Schichten, bei Nuphar luteum in einigen wenigen Zellen der oberen Epidermis und des Mesophylls.

Androeceum. Bei Nymphaea alba in einigen Zellen des Mesophylls und der Gefäßbündel, bei Nuphar luteum außerdem in einigen Epidermiszellen.

Gynoeceum und Frucht. Hauptsächlich in den peripheren Schichten.

Buxaceae

Buxus

Die Alkaloide von Buxus sempervirens L. (Fauré 1830) sind nur ungenügend untersucht. Das Hauptalkaloid Buxin ist wohl kaum in reinem Zustand gewonnen

---

[1]) M. Wagenaar, Mikrochemische reacties op Piperine, Pharm. Weekbl., 1929, LXVI, S. 405.

[2]) M. Pizzeti, Sulla localisazione dell' alcaloide nel Nuphar luteum e nella Nymphaea alba, Malpighia 1904, XVIII, S. 106.

worden. Es wird als ein amorphes Pulver geschildert, das bei 145—148° zusammensintert und dann ein wenig höher schmilzt. Sehr schwer in Wasser löslich, leicht in Weingeist, Äther, Chloroform.

Rosenthaler und Mosimann untersuchten Stengel und Blatt mit allgemeinen Alkaloidreagentien. Mit Brombromkalium + HCl entstehen braune Fällungen im Rindenparenchym und in den Markstrahlen des Holzteils. Kaliumquecksilberjodid gibt in denselben Zellen gelbliche Niederschläge und Kaliumwismutjodid verursacht eine Dunkel-Rotbraun-Färbung der ganzen Rinde und des Holzes. Mit Goldchlorid entstehen feine gelbbraune kristalliinsche Niederschläge in fast allen Zellen des Rindenparenchyms, in den Markstrahlen des Holzes und in der Epidermis. Im Blatt gibt Goldchlorid in einigen Epidermiszellen eine braunkörnige Fällung; auch Brombromkalium + HCl und Jodjodkalium + HCl geben in den gleichen Zellen Niederschläge.

In den Alkaloidzellen läßt sich auch Tannid nachweisen.

In den Buxaceen sind Alkaloide, wie Martin-Sans[1]) mit dem mikrochemischen Verfahren von Errera festgestellt hat, weit verbreitet. Sie finden sich bisweilen in besonderen sezernierenden Zellen.

Ranunculaceae

Aconitum

In den Aconitum-Arten finden sich eine Reihe von miteinander verwandten Alkaloiden, über die wir noch immer ungenügend unterrichtet sind. Hat sich doch selbst das lange Zeit für einheitlich gehaltene Akonitin von Aconitum napellus als ein Gemisch zweier Isomerer herausgestellt. Im Kraut von Aconitum napellus kommen 0,3 %, in den Knollen bis 1,25 %, im Mittel 0,8—0,9 % Alkaloid vor. Der Alkaloidgehalt der Mutterknollen ist eher ein wenig höher, als der der Tochterknollen. Die Seitenwurzeln können mehr Alkaloid enthalten als die Knollen (Brunner)[2]).

Nach Brunner nimmt der prozentische und absolute Alkaloidgehalt der Mutterknollen bis Anfangs Juli zu und fällt dann konstant bis zum Herbst; bei den Tochterknollen nimmt der prozentische Alkaloidgehalt bis zum September beständig ab und steigt wieder gegen den Spätherbst. Ihr absoluter Gehalt nimmt dagegen vom Frühjahr bis zum Herbst ständig zu.

Das Akonitin (Gemisch) aus Aconitum napellus löst sich in etwa 700 Teilen Wasser, 24 Teilen Weingeist, 40 Teilen Äther, leicht in Chloroform, Essigäther, Anilin und Benzol, kaum in Petroläther. Die von ihm bekannten Reaktionen sind wenig charakteristisch und die mikrochemischen Kristall-Reaktionen nicht für Lokalisationsstudien anwendbar. Man ist dafür auf die allgemeinen Alkaloidreaktionen angewiesen. Als bestes mikrochemisches Reagens für Aconitin empfiehlt

[1]) E. Martin-Sans, Généralité de la présence d'alcaloides chez les Buxacées, Compt. rend. Acad. sciences 1930, CXCI, S. 625.

[2]) G. E. Brunner, Diss. Zürich, 1921/22.

Tunmann[1]) Jodwasserstoff. Nach Entstehung des Niederschlags füllt man unter dem Deckglas von der Seite mit Weingeist auf. Es entstehen dann sofort flache, an einem Ende schwach abgerundete rhombische chromgelbe Kristalle, aus denen oft schmale, flache Prismen fächerförmig herauswachsen. Nicht selten entstehen außerdem flache Prismen, deren Spitzen mit feinen, zu Ähren angeordneten Kriställchen besetzt sind. Die Kristalle polarisieren lebhaft in gelben und roten Farben, die größeren besitzen gerade Auslöschung.

Clautriau (S. 16 der auf S. 442 gen. Lit.) fand zum Nachweis des Akonitins (Aconitum napellus) geeignet: Jodjodkalium (brauner Niederschlag), am besten nach Vorbehandlung mit Ammoniumkarbonat, Phosphormolybdänsäure, Kaliumquecksilberjodid und Tannin (sehr feine weißliche Fällung), Phosphorsäure (violette Färbung), sowie Schwefelsäure, die mit $\frac{1}{2}$—$\frac{1}{3}$ Volumen Wasser versetzt ist und die besonders nach vorausgegangenem Anfeuchten der Präparate mit Rohrzuckerlösung erst eine gelbe, dann eine karminrote Färbung bedingt. Diese Reaktion läßt sich auch mit getrocknetem Material ausführen, wenn man dasselbe durch Wasserdampf zuvor erweicht hat. Im Samen benutzte Barth (S. 36 der auf S. 439 gen. Diss.) außer den bereits genannten Reagentien noch die folgenden: Kaliumwismutjodid, Chlorzinkjodid (dunkelbraune Fällung), Pikrinsäure, Bromwasser, Goldchlorid und Kaliumdichromat (gelber Niederschlag), ferner Vanadin- oder Cersulfatschwefelsäure (färben die Randpartien des Endosperms grüngelb, das Zentrum des Endosperms rot). Statt Phosphorsäure anzuwenden, kann man die Präparate in festes Phosphorsäureanhydrid einlegen und erwärmen; es tritt eine violette Farbenreaktion ein, die im Zentrum des Endosperms am stärksten ist. Gute Dienste leistet Brombromkalium. Goris verwandte noch Phosphormolybdänsäure.

In Aconitum napellus finden sich die Alkaloide im Inhalt sämtlicher Zellen des Vegetationspunktes der Wurzel, dann im subepidermalen Gewebe (nicht in der Epidermis und in den Wurzelhaaren), sowie in der Umgebung der Bündel. Im Knollen ist Alkaloid in der Epidermis und im gesamten Parenchym, im Stengel: in der Nähe des Bastes, im subepidermalen Gewebe und um die austretenden Blattspurbündel, im Blatt: im ganzen Parenchym, besonders aber in den Schließzellen der Spaltöffnungen und den Basalteilen der Haare, in den Blumenblättern: in der Epidermis, in Staubgefäßen: vorwiegend in den basalen Teilen, nicht in den Antheren, im Fruchtknoten: in den Samenknospen. Im reifen Samen ist die Samenschale alkaloidfrei, hingegen führen Endosperm und Embryo Alkaloide. Wahrscheinlich

[1]) O. Tunmann, Beiträge zur mikrochemischen Toxikologie, Apoth.-Ztg., 1915, XXX, S. 678.

sind im Zentrum des Endosperms mehr Alkaloide zugegen als in den peripheren Teilen.

Bei Aconitum lycoctonum benutzt Vanderlinden[1]) Jodjodkalium (brauner Niederschlag), Quecksilberkaliumjodid (gelb), Phosphormolybdänsäure (blaßgelb), Pikrinsäure (gelb). Lokalisation in der Wurzel: Bast, Kambium, Markperipherie, Endodermis, Pericykel; im Stengel: Mark, Kambium, Bast; im Blatt: nur im Bast des Blattstieles; in der Blüte: in allen Organen, aber nicht im Ovulum und in den Antheren. In der Frucht ist die Epidermis reich an Alkaloiden.

Die Basen in Aconitum anthora werden nachgewiesen mit: Jodjodkalium (braun), Phosphormolybdänsäure (blaßgelb), Goldchlorid (grau, schwarz werdend), Pikrinsäure, Ferrichlorid (gelb). Lokalisation in Wurzel und Rhizom: Parenchym, besonders in der Peripherie, nicht in Vegetationspunkten und Wurzelhaaren; im Stengel: in den Siebröhren und im gesamten Phloem sowie im peripheren Mark, nicht in Epidermis und in Trichomen; im Blatte: nur im Blattstiel in dem dem Siebteil vorgelagerten Parenchym; in der Blüte: nur in den peripheren Geweben des Fruchtknotens, nicht im Ovulum (Vanderlinden). A. lycoctonum ist reicher an Alkaloid als A. anthora.

Bei Aconitum cammarum wies Theorin[2]) die Alkaloide mit Schwefelsäure (Violettfärbung) nach und findet sie im Stengel und im Knollen in der Umgebung der Bündel, ebenso in Blättern, die an heißen Sommertagen gepflückt waren.

Thalictrum

In der Gattung Thalictrum sind Alkaloide nachgewiesen in Th. macrocarpum Gren. (Doassan), Th. flavum L. und aquilegifolium L. Cuoghi Constantini[3]) hat die Lokalisation in den letzteren beiden mit Hilfe allgemeiner Alkaloidreagentien (Jodjodkalium, Chlorzink + Jod, Kaliumwismutjodid) studiert; für die Samen verwandte Goris Phosphormolybdänsäure, Chlorzink + Jod und Joddämpfe. Alkaloid befindet sich:

Im Rhizom: Im Rindenparenchym, Siebteil, Markstrahlen und Mark in der Umgebung der Gefäßbündel.

In Blättern und Blütenstielen: In den Epidermiszellen, einigen Zellen des Rindenparenchyms und der Endodermis und im Siebteil.

---

[1]) E. Vanderlinden, Rech. microchim. s. l. présence des alcaloides et des glycosides dans la famille des renonculacées, Rec. Inst. bot. Bruxelles, 1902, V, S. 135.

[2]) G. Theorin, Einige pflanzenmikrochemische Notizen, Sv. Vet. Öfvers, 1885, Nr. V, S. 29.

[3]) Luisa Cuoghi-Constantini: Nuove ricerche sulla localizzazione microchimica di alcaloidi e glucosidi in alcune Ranunculacee. Atti del reale Istituto veneto di scienze lettere ed arti 1911/12, LXXI, S. 1160.

In den Samen: In 2—3 äußeren Schichten des Endosperms und im Siebteil der Gefäßbündel der radicula.

Isopyrum

Isopyrum biternatum Torr. enthält nach Mac Dougal in Blättern (Epidermis) und Stengeln (Epidermis, Endodermis und Rindenzellen) eine bittere durch Jodjodkalium und Kaliumwismutjodid fällbare Substanz.

(Mac Dougal A contribution to the physiology of the root tubers of Isopyrum biternatum Torr. Minnesota, Bot. Studies, 1896, S. 501, nach Goris Localisation usw).

Über das Alkaloid von I. thalictroides fehlen phytomikrochemische Angaben.

Adonis

Vanderlinden hat allgemeine Alkaloidreaktionen in Adonis vernalis L., Cuoghi-Constantini solche mit A. aestivalis L. erhalten. Da aber die Glykoside ebenfalls solche Reaktionen geben, so genügt es, auf diese Beobachtungen hinzuweisen.

Caltha palustris L.

In Caltha palustris wurde von Johanson (Naturf. Ges. Dorpat, 1878, IV) ein Alkaloid von nikotinähnlicher Wirkung angegeben. Der mikrochemische Nachweis (Vanderlinden a. a. O.) wird erbracht mit Jodjodkalium, Pikrinsäure (gelbe Fällung), Ferrichlorid (graue Fällung), konzentrierter Schwefelsäure (vorübergehend rot). An dünnen Schnitten parenchymatischer Gewebe liefert Goldchlorid-Ameisensäure gute Erfolge (s. Aleuronfärbung). Die frischen Schnitte werden mit destilliertem Wasser abgespült und vor Luft geschützt 1½ Stunden in schwachem Goldchlorid mazeriert, dann abgewaschen und 2 Stunden im Lichte in 5proz. Ameisensäure gebracht, schließlich folgt Glyzerin, Einschließen in Kanadabalsam. Der graue Niederschlag des Goldsalzes ist nun blauschwarz geworden.

Die Verteilung der Alkaloide ist die folgende:

Wurzel: In zwei peripheren Zellschichten, dem Rindenparenchym, besonders in der Nähe des Zentralzylinders, in der Endodermis, dem Pericycel, den Begleitzellen der Siebröhren und dem Markparenchym.

Stengel: In der Epidermis und den benachbarten Zellen, in den den Holzzellen anliegenden Markzellen.

Blatt: Im Stiel wie im Stengel; in der Blattfläche in der oberen Epidermis und um die Nerven.

Blüte: Im Kelch in der Epidermis und um die Nerven, in den Staubfäden, in der inneren Epidermis und den Bündeln der Fruchtblätter.

Samen: Ein wenig in der Samenschale, nichts im Endosperm.

Delphinium

Im Samen von Delphinium staphisagria sind verschiedene Basen ermittelt worden, Delphinin (sechsseitige farblose Tafeln F. 191,8⁰ korr.), Delphinoidin, Staphisagrin (amorph), Staphisagroin und im frischen Samen Delphisin. Die chemische Kenntnis dieser Basen ist noch sehr lückenhaft.

Zum Nachweis benutzte Clautriau (Lit. S. 442, Sep. S. 16) Jodjodkalium, Phosphormolybdänsäure, Kaliumquecksilberjodid (Fällungen), Phosphorsäure (violette Färbung), verdünnte Schwefelsäure-Rohrzucker (gelb, karminrot); nach Vanderlinden fällt Pikrinsäure gelb, Tannin weiß. Nach den makrochemischen Befunden von O. Keller (Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 473) geben die Basen A und B aber nur mit Kaliumwismutjodid, Jodjodkalium, Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure noch bei 1 : 1000 Reaktionen. Base B auch mit Tannin; Pikrinsäure reagiert nicht.

Bei Delphinium hybridum eignen sich zum Nachweis der Basen: Jodjodkalium und Kaliumquecksilberjodid (gelbbraun), Pikrinsäure, Goldchlorid (gelbe Fällung), Platinchlorid (schwacher, gelber Niederschlag). — Delphinium consolida ist arm an Alkaloid: Jodjodkalium (bräunlich), Kaliumquecksilberjodid (gelbgrau), Phosphormolybdänsäure (blaßgelb), Goldchlorid (grauschwarz), Ferrichlorid (grau), Pikrinsäure (gelb), Schwefelsäure mit Bromwasser (gelb, diese Reaktion soll dem Delphinin zukommen).

Bei den genannten Pflanzen und auch bei D. Ajacis L. und grandiflorum L. sind die Basen überwiegend in gleicher Weise lokalisiert. Sie finden sich in der Wurzel: im Bast und im Parenchym; im Stengel und im Blatt: im Bast, Mark und in den peripheren Geweben.

Nigella damascena

Damascenin (Methylbetain der Methoxyanthranilsäure) wurde von Schneider 1889 in den Samen von Nigella damascena aufgefunden. Die Base bildet farblose, eigentümlich riechende Prismen F. 26⁰, die sich in Alkohol, Äther, Petroläther und Chloroform mit blauer Fluoreszenz lösen, in Wasser aber unlöslich sind. O. Keller fand (1904 u. 1908) in Nigella damascena 0,5—0,6 % salzsaures Salz (nur Damascenin), in N. aristata 0,1 % (Damascenin und Methyldamascenin), während alle anderen Nigellasamen (sativa, arvensis, orientalis, hispanica, integrifolia, diversifolia, garidella) alkaloidfrei waren.

Nach Boelling[1]) geben die Alkaloidzellen von Nigella damascena (Samen) Niederschläge mit Pikrinsäure, Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure, Bromwasser und Kaliumkadmiumjodid, die sich aber

[1]) G. Boelling, Beitr. z. Kenntnis einiger alkaloidhaltiger Pflanzen mit Berücksichtigung ihrer Anatomie und des mikrochem. Nachweises ihrer Alkaloide, Dissertation, Erlangen 1900, S. 53.

über den ganzen Schnitt verteilen. Bessere Resultate liefern Joddämpfe, Jodjodkalium, Chlorzinkjod, Kaliumwismutjodid (rotbraune Niederschläge). Der grauweiße Niederschlag, den Kaliumquecksilberjodid erzeugt, läßt sich durch Schwefelwasserstoffwasser besser sichtbar machen. Goldchlorid erzeugt nach 2 Stunden kleine gelbe, im polarisierten Lichte aufleuchtende Kristalle. Während E. Schneider (Erlanger Dissert., 18889) den Sitz des Damascenins in die Samenschale verlegte, erhielt Boelling die oben genannten Reaktionen im ganzen Samen (also auch im Embryo und im Endosperm) mit Ausnahme der 2. und 4. Schicht der Testa. Während ferner die Chemiker nur ein Alkaloid angeben, gelangt Boelling zu dem Schluß, daß das Damascenin seinen Sitz nur in der Epidermis der Samenschale hat, daß aber im Samen „mindestens noch ein anderes Alkaloid (Nigellin, Connigellin?) in der 3. Schicht der Samenschale, im Endosperm und im Embryo enthalten ist". Für diese Ansicht sprechen außer den erwähnten Reaktionen die Kristalle, welche verdünnte Mineralsäuren erzeugen. Durch verdünnte Schwefelsäure entstehen nach 2 Stunden in der Epidermis der Samenschale feine nadelförmige Kristalle, hingegen in der 3. Schicht der Testa, im Endosperm und im Embryo rhombenförmige Tafeln, durch verdünnte Salpetersäure in der Epidermis feine Nadeln, im übrigen Gewebe keine Kristalle, durch verdünnte Salzsäure farnkrautartig verzweigte Kristalle in der 3. Schicht der Testa, im Endosperm und Embryo. Die äußere Samenschale, getrennt mit Salpetersäure behandelt, gibt keine Kristalle. Diese Reaktionen bleiben bei alkaloidfreien Schnitten aus.

Vanderlinden hat im reifen Samen von N. damascena kein Alkaloid nachweisen können. Hingegen erhielt er in der Wurzel (ob von der gleichen Pflanze, ist nicht feststellbar) schwache Reaktionen im Kambium, Pericykel, Endodermis und in einigen Zellen des äußeren Rindenparenchyms (Jodjodkalium, Kaliumquecksilberjodid; Schwefelsäure färbt nicht). Die Pflanze scheint ein empfehlenswerter Gegenstand für Studien über die Individualität der Alkaloidpflanzen zu sein. —

In Ranunculus (lingua, repens, sceleratus, muricatus, acris, tuberosus, arvensis) hat Vanderlinden weder Alkaloide noch Glykoside (mit konzentrierter Schwefelsäure) nachweisen können. Erfolglos waren ebenfalls die Untersuchungen von Clematis (vitalba, stans), Cimicifuga (americana, foetida), Ficaria (ranunculoides, calthaefolia), Thalictrum (adiantifolium, anemonoides), Eranthis hiemalis, Paeonia (officinalis, mollis), Anemone (japonica, nemorosa, pratensis, pulsatilla), Actaea spicata.

Cuoghi-Costantini fand Alkaloid in der Wurzel von Nigella damascena L., nicht in der von N. sativa, in der Frucht bei beiden Arten

in den Epidermen, im Samen vorzugsweise in den äußeren Schichten des Endosperms.

Helleborus viridis

Die Wurzel von Helleborus viridis enthält nach O. Keller 4 Alkaloide in der Gesamtmenge von 0,2 %:

Celliamin. Farblose seidenglänzende kleine Nadeln. F. 127—131° (nach Sinterung bei 115°).

Sprintillamin. Farblose seidenglänzende kleine Nadeln, F. 228—229°.

Sprintillin. F. 141—142° (nach Sintern bei 132°). Alkaloid „V". Nadeln F. 267—268° (über 210° dunkelbraun).

Sämtliche Alkaloide geben nach Keller[1]) dieselben Farbenreaktionen: Mit konz. Schwefelsäure: gelb, übergehend in braun. Mit konz. Schwefelsäure + Spur $FeCl_3$: gelb übergehend in braun. Mit Formalin-Schwefelsäure: braunrot, das einen violetten Stich bekommt. Mit Froehdes Reagens: gelb übergehend in braun. Mit Erdmanns Reagens ebenso.

Berberidaceae

Hydrastis canadensis

In den unterirdischen Organen von Hydrastis canadensis L. kommt neben Berberin (s. S. 463) und Kanadin das Hydrastin vor (Durand 1851). Der Wurzelstock (bis 3,8 %) enthält etwa das doppelte wie die Nebenwurzeln. Auch in den oberirdischen Teilen ist Hydrastin nachgewiesen.

Hydrastin bildet vierseitige rhombische Prismen F. 132°. Unlöslich in Wasser, leicht löslich in Chloroform, Benzol und heißem Weingeist, schwer in Äther, kaum in Petroläther. Durch Oxydationsmittel geht Hydrastin in Hydrastinin und Opiansäure über.

Der Nachweis außerhalb der Zelle läßt sich — nach vorhergegangener Extraktion — teils durch Farbenreaktionen, z. B. die Rotfärbung mit Vanadin-Schwefelsäure erbringen, teils durch Kristallfällungen, wie sie z. B. mit p-Nitrophenylpropiolsäure oder Pikrolonsäure entstehen.

Ein Tropfen einer 1proz. wässerigen Hydrastinchloridlösung gibt mit einem Tropfen wässeriger Glycerin und Weingeist enthaltenden Pikrolonsäurelösung einen amorphen hellgelben Niederschlag, der durch gelindes Erwärmen, nachherigen Zusatz eines Tropfens Weingeist und abermaliges Erwärmen kristallinisch wird. Die größeren Kristalle erscheinen unter dem Mikroskop hellgelb, die kleineren fast farblos und bilden ziemlich breite, an den Enden wie abgebrochen, oft auch wie gespalten erscheinende Nadeln, oft mit pinselartigen Ansätzen an den Enden. Sie bilden Kristallaggregate in Form von Kreuzen, kleinen Sternen, Rosetten und rutenförmigen Büscheln (A. Mayrhofer).

Auch die Überführung des Hydrastins in Hydrastinin und Opiansäure und die Identifizierung der beiden Oxydationsprodukte läßt sich heranziehen, s. S. 462. Sublimieren läßt sich Hydrastin nicht.

[1]) O. Keller, Arch. d. Pharmazie, 1928, CCLXVI, S. 545.

Am einfachsten ist der Nachweis des Hydrastins nach Klein und Schilhab[1]): Man versetzt ein wenig Drogenpulver mit einer Mischung von Äther und Petroläther und läßt in der Ammoniakkammer verdunsten. Betrachtet man das Präparat dann bald unter dem Mikroskop, so sieht man rings um das Pulver (aber auch im Pulver) viele farblose Prismen von Hydrastin und große gelbe Tropfen, aus denen nach längerem Stehen ebenfalls farblose Hydrastinkristalle auskristallisieren.

Der Nachweis vermittels Opiansäure erfolgt nach beiden Autoren in folgender Weise: Das feingepulverte und zerriebene Material wird mit verdünnter Salpetersäure zu einem Brei angerührt und bei 60° eintrocknen gelassen. Die rotgefärbte Masse wird mit einem Tröpfchen Phosphorsäure versetzt und auf 80—90° erwärmt. Der schwarze Brei wird im Mikrosublimationsapparat auf 180° erhitzt und ca. eine Viertelstunde gelassen. Neben Tropfen und Körnern von Zersetzungsprodukten zeigt das Sublimat farblose, dünne Nadeln und verzweigte oft gebogene, bis 2 mm lange Kristalle von Opiansäure (F. 150°). Kocht man mit einer Harnstofflösung unter Zusatz eines Tropfens Schwefelsäure wiederholt auf, so scheiden sich nach dem Erkalten bräunliche fedrige Kristalle des Ureids ab, die auch bleiben, wenn man den überschüssigen Harnstoff mit Wasser gelöst hat. Nimmt man statt Harnstoff eine gesättigte Phenylurethanlösung, so erhält man farblose, sonnenförmig angeordnete Kristalle.

Grutterink[2]) extrahiert mit Chloroform und weist als Hydrastinin nach. Der Rückstand wird mit verdünnter Salzsäure aufgenommen, zur Trockne gebracht, mit einem kleinen Tropfen Ammoniak aufgenommen und abgedampft. Nun löst man diesen Rückstand in etwas Wasser und fügt Kaliumpermanganat zu. Es bilden sich sofort oder nach einiger Zeit violette Kristalle der Kaliumpermanganatverbindung des Hydrastinins.

Tunmann[3]) läßt 0,01 g Pulver oder zwei kleine Schnitte auf dem Objektträger mit einem Tröpfchen verdünnter Salzsäure (1 : 10) durchfeuchten und nach Auflegen des Deckglases Chloroform zusetzen. Wenn nach 3—5 Minuten das Chloroform zum Teil verdunstet ist, beginnt die Abscheidung von rein weißen Prismen des Hydrastins um das ganze Präparat herum. Am Deckglasrande gelbe Zonen von Berberin.

[1]) G. Klein u. A. Schilhab, Der Nachweis von Hydrastin, Österr. bot. Zeitschr., 1928, LXXVII, S. 14.

[2]) A. Grutterink, Beiträge zur mikrochemischen Analyse einiger Alkaloide und Drogen, Diss. Rotterdam, 1910, S. 78.

[3]) O. Tunmann, Beiträge zur Mikrochemie einiger Wurzeldrogen. Anhang zum Handelsberichte der Firma Gehe u. Co., Dresden, 1912.

Weniger gut ist der Nachweis des Hydrastins in der Zelle ausgearbeitet. Herder[1]) wandte Caesiumquecksilberjodid (in 30 proz. wässeriger Chloralhydratlösung, Empfindlichkeitsgrenze 1 : 2000) und Baryumquecksilberjodid (1 : 2400) an. Es entstehen amorphe Niederschläge, die sich durch ihre weiße Färbung von der gleichzeitig entstehenden gelben Berberinfärbung unterscheiden lassen sollen.

Goris[2]) bringt einen Schnitt der Wurzel in Vanadin-Schwefelsäure. Die Rotfärbung tritt dann sehr rasch ein im inneren Rindenparenchym, in der Mitte des Zentralzylinders, einigen Zellen der Endodermis und im Siebteil, während die äußeren Schichten des Parenchyms gelb bleiben. Nachträglich bilden sich Kristalle von Berberinsulfat.

Im Rhizom findet Goris das Hydrastin im parenchymatischen Teil des Zentralzylinders.

Von Rosenthaler und Mosimann (l. c. S. 433) wurde das Blatt von Hydrastis untersucht. Brombromkalium + HCl gibt in den meisten Parenchymzellen des Blattes, auch in den Epidermen, braungraue, körnige Fällungen. Silikowolframsäure zeigt in denselben Gewebepartien graue kristallinische Ausscheidungen. Im Nerven findet sich Alkoloid hauptsächlich in Epidermis und Hypodermis.

In den Alkaloidzellen kommt auch Tannid vor.

Berberin

Berberin (Hüttenschmidt 1824) wurde früher für viele Familien angegeben (Berberideen, Ranunculaceen, Anonaceen, Menispermaceen, Papaveraceen, Leguminosen, Rutaceen). Gordin zeigte, daß Berberin in Jatrorrhiza palmata Miers, Menispermum canadense L., Jeffersonia diphylla Pers., und in Radix pareirae bravae (Cissampelos ?) fehlt. Bauer hat es ebenfalls in einer ganzen Anzahl Pflanzen, die man früher als berberinhaltig bezeichnete, nicht auffinden können. Berberin fand sich jedoch in Berberis aquifolium Pursh., B. fascicularis Sims. B. vulgaris L., B. cerasina Schrad.. B. canadensis Pursh., B. lucida Schrad., ferner in Hydrastis canadensis L. (Wurzelstock), Coptis trifolia Salisb. (Stengel) und Xanthorrhiza apiifolia (Stengel). Die Blätter der Berberisarten sollen das Alkaloid nicht führen. Hingegen sollen nach Rosoll in der erwachsenen Pflanze bei Berberis vulgaris alle Organe mit Ausnahme der Blüte Berberin führen. Doch konnten weder Tunmann noch Klein und Bartosch in den Blättern Berberin nachweisen. Im Keimling kommt es in geringer Menge vor. Die größten Mengen finden sich an Orten mit regem Stoffwechsel.

Weitere Angaben über berberinhaltige Pflanzen, die sich aber nur auf mikrochemische Reaktionen stützen, finden sich bei Klein und Bartosch. Nach ihnen

[1]) M. Herder, Über einige neue allgemeine Alkaloidreagentien und deren mikrochemische Verwendung, Diss. Straßburg, 1905, S. 38.

[2]) A. Goris, Localisation usw. S. 78.

kommt Berberin bei Hydrastis canadensis in der ganzen Pflanze vor, bei Mahonia aquifolium überall in der Wurzel, wenig im Stamm und nur in Spuren im Blatt.

Berberin kommt in zwei Formen vor als in Wasser leichtlösliche quarternäre Ammoniumbase und in Wasser schwerlösliche tertiäre Aldehydbase. Letztere bildet das Handelsprodukt. Gelbe Nadeln. F. 144°. Leicht in Weingeist, schwer in Äther, Essigäther, Benzol und Petroläther löslich.

Von den Farbenreaktionen des Berberins sei die mit Chlorwasser (Chlorkalk und Salzsäure) eintretende Rotfärbung hervorgehoben. Kristallfällungen treten u. a. ein mit Salpetersäure und Schwefelsäure, Jodjodkalium und Pikrolonsäure.

Nach Klein und Bartosch[1]) eignen sich zum Nachweis des Berberins im weingeistigen Extrakt am besten Jodjodkalium, Bromkalium und Salpetersäure, im wässerigen Jodkalium, Bromkalium und Salpetersäure. Sie extrahieren je nach dem Berberingehalt 0,1—2 g fein zerriebenes Material im Mikroextraktionsapparat mit 3—4 ccm Wasser oder Weingeist, engen das Filtrat auf 1—1,5 ccm ein und verwenden je 1—2 Tropfen zu den Reaktionen.

Eine 1proz. Berberinsulfatlösung gibt mit wässeriger Pikrolonsäurelösung intensiv gelbe, zierliche reichlich verzweigte Dendriten, Sterne mit gelbem Mittelpunkt und lange dünne, oft ineinander verflochtene Fäden. Daneben entstehen auch gelbe, amorphe schollenförmige Klumpen und bei großer Verdünnung zuweilen auch feine viereckige Blättchen. Die Kristalle und Klumpen färben sich mit einer Mischung gleicher Teile von Jodtinktur und Glyzerin braun bis schwarz (Hydrastinkristalle unverändert oder stärker gelb). Fügt man zu einer wässerigen Hydrastin-Berberinsalzlösung ein Gemisch von 6 Teilen wässeriger gesättigter Pikrolonsäurelösung 3 Teilen Glyzerin und 1 Teil Jodtinktur, so fallen nach dem Erwärmen sofort dunkelbraun gefärbte Berberinkristalle (neben hellgelb gefärbten Hydrastinkristallen) aus. Versetzt man das Gemisch von Berberin- und Hydrastinpikrolonat mit Perhydrit-Schwefelsäure (einige Körnchen Perhydrit in 2 ccm Schwefelsäure), so lösen sich die Berberinkristalle mit brauner Farbe, die Hydrastinkristalle farblos.

Behandelt man einen Schnitt durch getrocknetes Hydrastisrhizom ohne Befeuchtung mit der Glyzerin und Weingeist enthaltenden Pikrolonsäurelösung, so erhält man bald die von Berberin und etwas später die von Hydrastin (s. S. 461) herrührenden Kristalle, die man dann in der oben beschriebenen Weise unterscheiden kann (Mayrhofer[2]).

---

[1]) G. Klein u. H. Bartosch, Der Nachweis von Berberin, Österr. bot. Zeitschr., 1928, LXXVII, S. 1.

[2]) A. Mayrhofer, Mikrochemischer Nachweis von Hydrastin und Berberin in der Pflanze, Pharmaz. Post, 1914, XLVII, S. 547.

In den Samen von Hydrastis fand E. Senft[1]) das Berberin, zu dessen Nachweis er Chlorzinkjod verwandte, in manchen Zellen oder Zellkomplexen in festem Zustand, entweder in amorphen Massen oder in Kristallen. Der ganze Zellinhalt des Endosperms und die Zellmembranen sind gewöhnlich durch Berberin gelb gefärbt. Eine bestimmte Lokalisation von Berberin und Hydrastin scheint nicht vorhanden.

Hat man im Hydrastisrhizom das Hydrastin nach Klein und Schilhab nachgewiesen (s. S. 462), so kann man in demselben Präparat noch das Berberin nachweisen. Man versetzt von einer Seite her mit einer Spur Salzsäure, nachfolgend mit wenig Chloroform und bedeckt diese eine Hälfte mit dem Deckglas, worauf an dieser Stelle Berberin in gelben Nadeln oder kleinen schlanken Prismen auskristallisiert (Klein und Schilhab).

Über die Lokalisation des Berberins im Gewebe lauten die Angaben widersprechend. Bauer[2]) sagt, „daß Berberin nicht in allen Zellen der Pflanze gleichmäßig auftritt“. Er schließt dies aus der verschieden langen Zeit, die bis zur Kristallbildung erforderlich ist. Allen genannten Methoden haftet der Mangel an, daß die Kristalle im Untersuchungstropfen oder über dem Präparate entstehen, wenigstens nicht scharf genug in den Zellen selbst. Nur Zimmermann[3]) sagt bei Nachprüfung des Salpetersäure-Verfahrens, daß sich das Berberinnitrat „im Innern der berberinhaltigen Zellen“ abscheidet, was nicht ganz richtig (s. Fig. 107c), während Herrmann und Rosoll der Ansicht sind, daß es sich in dünnwandigen Zellen im Zellinhalt, in dickwandigen Zellen jedoch in der Membran findet. Dieser Meinung ist auch Herder; bei Fibraurea ist es im Holze in der Membran, im Parenchym dort und bei Hydrastis im Inhalte. Übrigens hat Boedeker schon 1848 die Anschauung vertreten, daß Berberin nur in der Membran auftritt. Bei vorsichtiger Präparation hat Tunmann Berberin stets, auch in dickwandigen Elementen, nur im Zellinhalte in Form von Ballen angetroffen (Fig. 107b).

Goris legt die Schnitte in Glyzerinwasser und findet so die gelben Berberinzellen scharf abgegrenzt. Er findet in der Wurzel von Hydrastis canadensis zwei bis drei Reihen von ihnen unmittelbar unter der Korkschicht; nach innen vermindern sie sich. Sie finden sich weiter in der Endodermis und dem den primären Gefäßen anliegenden Holz-

[1]) E. Senft, Über den Hydrastis-Samen, Zeitschr. allgem. österr. Apoth.-Ver., *1913*, *LI*, S. *509*.

[2]) K. Bauer, Der mikrochem. Nachweis des Berberins in Pflanzen und Drogen, Zeitschr. d. öst. Apoth.-Ver., 1908 u. Jahresb. f. Pharm., 1908, S. 116.

[3]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechn., 1892, S. 118.

parenchym. Legt man die Schnitte in konzentrierte Kochsalzlösung, so treten gelbe Nädelchen von Berberinchlorid auf.

Im Rhizom von Hydrastis sind nach Goris[1]) die Rindenzone und die dem Zentralzylinder benachbarten Gewebe reich an Berberin.

Im Hydrastisrhizom findet sich das Berberin nach Tunmann ausschließlich im Zellinhalt des Parenchyms. Das Mark, in dem einzelne Zellen alkaloidfrei sind, enthält weniger Berberin als die Rinde.

Gelegentlich chemischer Studien hat sich bereits 1848 Boedeker[2]) mit dem mikrochemischen Nachweis des Berberins befaßt. Die Arbeit ist bemerkenswert, denn sie ist eine der ersten auf mikrochemischem Gebiete und wohl die erste, welche Alkaloide im pflanzlichen Gewebe zu ermitteln sucht. Er bediente sich der Salpetersäure und untersuchte

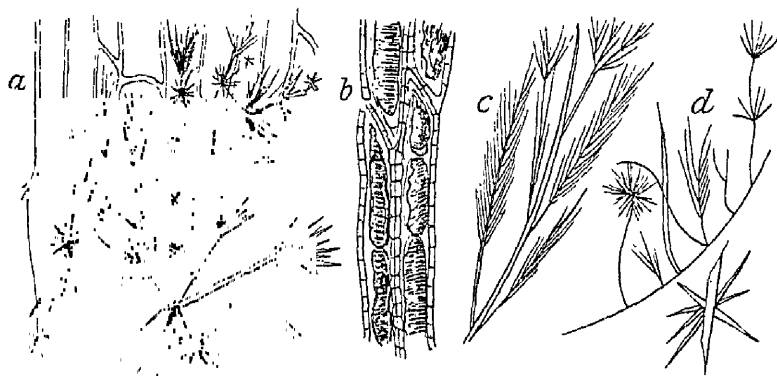



Fig. 107. Berberin. *a*) Berberis vulgaris, Tangentialschnitt aus dem Phloemparenchym der Rinde mit Kristallen von salzsaurem Berberin (mit 10proz. Salzsäure); *b*) Hydrastis canadensis, Libriformzellen der Droge mit eingetrockneten Ballen von Berberin; *c*) Kristalle von salpetersaurem Berberin aus Hydrastispulver; *d*) Kristalle der Jodverbindung (mit Alkohol-Jodjodkalium) (Tunmann)

Berberis vulgaris (und Menispermum palmatum, die aber kein Berberin führt). Naegeli und Schwendener[3]) fanden, daß der gelbe eingetrocknete wässerige Auszug der Rinde von Berberis vulgaris auf Zusatz von Salzsäure gelbe Nadeln von salzsaurem Berberin gibt, die meist strahlenförmig angeordnet sind. Herrmann[4]) legte die Schnitte zuerst auf dem Objektträger in etwas Alkohol. Bei nachfolgendem Zusatz von stark verdünnter Salpetersäure (2 : 100 Wasser) geht die goldgelbe Färbung in Braun über, und es scheiden sich alsbald goldgelbe stern- und büschelförmig verwachsene Nadeln von Berberinnitrat aus. Das Verfahren rührt, wie wir sahen, von Boedeker her. Wenig geeignet ist Schwefelammonium, das Herrmann eben-

[1]) A. Goris, Localisation usw. S. 78.

[2]) Boedeker, Ann. d. Chem. u. Pharm., 1848, LXVI, S. 384.

[3]) C. Naegeli u. S. Schwendener, D. Mikroskop, II. Aufl., 1877, S. 504.

[4]) O. Herrmann, Nachw. einiger organisch. Verbind. in den vegetabilischen Geweben, Dissertation, Leipzig, 1876, S. 16.

falls empfiehlt und mit dem er eine braune Farbenreaktion erhielt. Es ist bezeichnend, daß gerade bei der berberinfreien Jatrorrhiza palmata Schwefelammon die besseren Erfolge gab. Rosoll[1]) brachte Präparate von Berberis in Alkohol und setzte eine geringe Menge Jodjodkaliumlösung zu. Es bilden sich Kristalle, die in unterschwefligsaurem Natrium löslich sind. Sie sind haarförmig und von grüner Farbe. Bei Zusatz von größerer Menge Jodjodkalium entstehen gelbe bis rotbraune Kristalle. Nach Tunmann[2]), der die Reaktion für brauchbar hält, zumal eine Blaufärbung der Stärke durch den Alkohol und die sofortige Bindung des Jods verhindert wird, entstehen aber beide Kristallformen (Fig. 107d) in den Präparaten nebeneinander, gleichgültig, ob viel oder wenig Jod zugesetzt wurde. Gleichwohl hängen die Kristallformen von der Jodmenge ab, die wir aber schwer regulieren können, da sie bedingt wird von Strömungen und dem Eindringungsvermögen der Reagentien in die Zellen. Tschirch und Oesterle[3]) führen Farbenreaktionen aus; die Schnitte umgeben sich beim Behandeln mit Brom- oder Chlorwasser bei Zusatz von Schwefelsäure mit einer blutroten Zone; ferner weisen sie Berberin im Rhizom von Hydrastis canadensis nach, indem sie aus den Präparaten mit Chloroform zunächst das Hydrastin (S. 461) entfernen. Die hydrastinfreien Präparate werden im ausgehöhlten Objektträger mit einigen Tropfen Wasser ausgezogen. Das wässerige Auszug wird eingedunstet. Der Rückstand wird nun mit Chromatschwefelsäure braun, mit Salpetersäure gelbrot, mit Wismutnitrat und Schwefelsäure violett bis braun. Chlorwasser oder Bromwasser färben nach vorangegangenem Zusatz von Schwefelsäure blutrot. Das Verfahren von Grutterink[4]) lehnt sich an diese Methode an. Das mit Chloroform ausgezogene (vom Hydrastin befreite) Hydrastispulver wird mit etwas Wasser extrahiert. Der wässerige Auszug zeigt beim Einengen bereits die Berberinkristalle; anderenfalls lassen sich solche durch Kaliumjodid oder Kaliumnitrat hervorrufen.

Kalziumquecksilberjodid und Baryumquecksilberjodid in 30proz. wässeriger Chloralhydratlösung gelöst wandte Herder[5]) an. Bei dem

[1]) A. Rosoll, Über den mikrochem. Nachw. d. Glykoside und Alkaloide in d. vegetabil. Geweben, 25. Jahresber. d. Realgym. Stockerau, 1889/90, S. 20.

[2]) O. Tunmann, Beiträge zur Mikrochemie einiger Wurzeldrogen, Gehes Ber., 1912, Anhang, S. 178.

[3]) Tschirch-Oesterle, Anat. Atlas, 1900, S. 282.

[4]) A. Grutterink, Beitr. z. mikroch. Analyse, Berner Dissertation, Rotterdam 1910.

[5]) M. Herder, Über einige neue allgemeine Alkaloidreagentien und deren mikrochemische Verwendung, Dissertation Straßburg, 1905, S. 33.

ersten Reagens ist die Empfindlichkeitsgrenze 1 : 65000, bei dem zweiten 1 : 80000. Untersucht wurden Rhizom und Wurzeln von Fibraurea chloroleuca und Hydrastis canadensis. Die Schnitte wurden in das Reagens direkt eingelegt und, bei mit Kanadabalsam umrandetem Deckglase, einer 24stündigen Beobachtung unterworfen. Es entstanden bei Fibraurea gelbe drusenartige Berberinkristalle in den Sklerenchymfasern und in den Gefäßen. Hier findet es sich in den Wandungen. Im Parenchym trat es im Zellinhalte auf. Bei Hydrastis fand es sich „fast ausschließlich nur im Parenchymgewebe", „da das ganze Parenchymgewebe mit den gelben Kriställchen übersät war".

Eingehend hat sich ferner Bauer[1]) mit dem Berberinnachweis an einem größeren Pflanzenmaterial beschäftigt (s. oben) und die Azeton-Berberin-Methode benutzt. Längsschnitte durch das Rindenparenchym von Stengeln und Wurzeln werden auf dem Objektträger in einigen Tropfen Wasser einige Sekunden liegengelassen (zur Lösung der Berberins); sodann wird ein Tropfen 10proz. Natronlauge und 4—5 Tropfen Azeton hinzugefügt, das Deckglas aufgelegt und vorsichtig erwärmt. Es entstehen Azeton-Berberin-Kristalle (grünlich glänzende Schüppchen). Bei Drogenmaterial ist nach Tunmann beim Nachweis mit Säuren ein vorheriges Einlegen der Schnitte auf kurze Zeit in verdünnten Alkohol zweckmäßig. Dämpfe von Ammoniak färben nur braun, solche von Salpetersäure bilden undeutlich kristallinische Massen. Beim direkten Eintragen lebender Zellen in Bromwasser bilden sich rötliche Fällungen, überwiegend im Inhalte der Zellen.

Am einfachsten weist man Berberin nach, indem man das Material (Schnitte, Pulver) mit ein wenig Wasser aufkocht und nach dem Erkalten einen Tropfen Salpetersäure zusetzt: Nadeln von Berberinnitrat. Der mit Salzsäure angesäuerte wässerige Auszug wird durch ein Körnchen Chlorkalk rot. Zieht man ein wenig Hydrastispulver mit 2 ccm ammoniakalischem Chloroform aus und läßt das Filtrat in ein Vanadin-Schwefelsäure enthaltendes Porzellanschälchen tropfen, so tritt in der Mitte eine vom Berberin herrührende schwarzbraune Färbung ein (am Rande eine vom Hydrastin herrührende violette) (Rosenthaler)[2]).

Im Stengel von Berberis vulgaris erhielten Rosenthaler und Mosimann mit Brombromkalium+HCl und Jodjodkalium+HCl in den meisten Parenchymzellen der primären Rinde einen deutlichen

[1]) K. Bauer, Der mikrochem. Nachweis des Berberins in Pflanzen und Drogen, Zeitschr. österr. Apoth.-Ver. 1908 und Jahresb. f. Pharmaz., 1908, S. 116.

[2]) L. Rosenthaler, Chemische Charakterisierung von Drogen, Schweiz. Apoth.-Ztg., 1924, LXII, S. 153.

bräunlichen Niederschlag. Bei den jungen Blättern war mit Jodjodkalium+HCl in den Nerven eine schwache Fällung zu beobachten.

Das Alkaloid scheint von Tannid begleitet.

Lokalisation des Berberins in Berberis vulgaris (nach Sauvan und Goris)[1]).

Wurzel: Im Rindenparenchym, Siebteil, Kambium, in den Markstrahlen, Gefäßen und Holzfasern.

Stengel: In jungen Sprossen findet sich das Berberin im Rindenparenchym, dem Siebteil und Kambium, ferner in den Markstrahlen und einigen den Gefäßen benachbarten Zellen des Marks. Immer findet es sich im Zellsaft und nicht in den Membranen.

Blatt: Im Blattstiel ist das Berberin in den Epidermis-, Parenchym- und Saftzellen. In der Blattfläche sind die Epidermen reich an Alkaloiden, man findet sie aber auch im Siebteil der sekundären Nerven und im Chlorophyllparenchym.

Samen: Alle Zellen des Endosperms und des Keimlings geben kräftige Alkaloidreaktionen; letzterer enthält mehr Alkaloid als das Endosperm.

Epimedium

In der Wurzel der Berberidee Epimedium alpinum fand Senft[2]) im Auszuge und im äußeren Rindenparenchym starke Fällungen mit Jodjodkalium, Tanninlösung, Phosphorwolframsäure, Pikrinsäure, Phosphormolybdänsäure, Kaliumwismutjodid, Kaliumquecksilberjodid und Goldchlorid. Wenn die Reaktionen auch nicht für Berberin sprechen, so deuten sie doch auf ein Alkaloid. Nach Bauer (l. c.) fehlt Berberin in Epimedium.

Jeffersonia

In Jeffersonia diphylla Pers. (Berberidaceae) findet sich ein dem Berberin nahestehendes Alkaloid, dessen Lokalisation von Hermann studiert worden ist.

Wurzel: In vereinzelten Zellen des Rindenparenchyms, besonders des äußeren.

Blattstiel: In vereinzelten Zellen des Parenchyms und der Membran der Gefäße.

Menispermaceae

Jatrorrhiza palmata

In der Wurzel von Jatrorrhiza palmata Miers (Radix Colombo) nahm man lange Berberin an. Gadamer, Günzel, Feist und E. Späth zeigten, daß darin Alkaloide vorkommen, die dem Berberin in chemischer Hinsicht sehr nahe stehen,

[1]) Goris, Localisation usw. S. 80.

[2]) Em. Senft, Über Epimedium alpinum, Pharm. Praxis, 1901, I, Heft 7.

Jatrorrhizin, Columbamin und Palmatin. In mikrochemischer Hinsicht sind die Alkaloide ungenügend beschrieben. Der erste, der Angaben über die Lokalisation gemacht hat, ist O. Hermann (l. c. S. 466) gewesen.

Die Colombo-Alkaloide hat weiter Rundquist[1]) mikrochemisch verfolgt. Nach dem damaligen Stande der Wissenschaft sollte außer Colombin noch Berberin, an Colombosäure gebunden, in der Wurzel zugegen sein. Zum Nachweis wurde Schwefelsäure benutzt, die in Xylem und Phloem Kristallbildung hervorruft; große prismatische sternförmig gruppierte Nadeln werden als Berberin angesprochen, kleine, einzeln liegende Säulen als Colombin. Später wurde gezeigt, (Tunmann[2])), daß hier Verwechslungen mit Kalziumsulfat vorliegen, denn einmal findet sich Kalziumoxalat in Nadelform in der Nähe des Kambiums und außerdem ist die Mittellamelle sehr kalkreich, so daß durch die Säure weitere Gipskristalle entstehen. Im übrigen färbt Schwefelsäure, sowohl allein als auch in Verbindung mit Chlor- oder Bromwasser, rot. Nach Rundquist geben Pikrinsäure, Quecksilberchlorid, Kaliumdichromat, rotes Blutlaugensalz nur schwer sichtbare Niederschläge. Empfohlen wird hingegen zum Nachweis des vermeintlichen Berberins Ammoniumphosphormolybdat, dessen Niederschlag sich in Ammoniak mit blauer Farbe löst und dadurch kenntlich wird. Die Schnitte werden nach der Molybdänbehandlung im Uhrgläschen gut ausgewaschen, um den Inhalt der angeschnittenen Zellen zu entfernen, und nachher mit Ammoniak behandelt. Der Niederschlag war „in den äußeren Teilen der sekundären Rinde, in dem zwischen den Baststrahlen liegenden Parenchym, das aus tangential etwas stärker gestreckten Zellen besteht“, zugegen, nahm nach dem Kambium hin ab und trat im Holz „vorzugsweise in den älteren Gewebselementen der Markstrahlen“ auf. Der Maximalgehalt wurde ermittelt, indem der Molybdatniederschlag durch Schwefelwasserstoff in Sulfid übergeführt wurde und fand sich „ein Drittel des Weges zwischen Zentrum und Kambium, von ersterem entfernt, in der Rinde dagegen relativ etwas näher dem Meristem“ und soll makroskopisch durch die intensivere Gelbfärbung der betreffenden Region erkennbar sein. Diese Lokalisationsangabe bezieht sich nach Tunmann[3]) auf das Columbamin Feists (nach Späth = Palmatin), welches mit Natriumjodid oder Kaliumjodid (1 : 20) hellgelbe amorphe

[1]) C. Rundquist, Mikrochemische Untersuchung der Radix Colombo, Schweiz. Wochenschr. f. Chem. u. Pharm., 1901, XXXIX, S. 280.

[2]) O. Tunmann, Über das Vorkommen von Kalziumoxalat in der Radix Colombo, Pharm. Centralhalle, 1906, XLVI, S. 1069.

[3]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie der Colombowurzel, Apoth.-Ztg., 1912, XXVII, S. 268.

Massen bildet, die die Zellumina erfüllen und nicht zur Kristallisation gelangen. Mit den gleichen Reagentien wird jedoch Jatrorrhizin in rötlichen kugligen Bildungen gefällt, die nach dem Austrocknen der Schnitte im Exsikkator sphärokristallinischen Aufbau zeigen und im polarisierten Lichte aufleuchten.

Jatrorrhizin ist ganz überwiegend im äußeren Rindenparenchym (in der Sklereidenzone) und in den Sklereiden selbst lokalisiert. Weiter nach innen zu nimmt der Jatrorrhizingehalt ab, um in der Nähe des Kambiums wieder anzusteigen. Die Alkaloide sind auch im Mikrosublimat, aber in nur undeutlich kristallinischer Form, zugegen. Palmatin gibt wie das Berberin eine Azetonverbindung (s. S. 468), die man mit Präparaten aber nicht erhält.

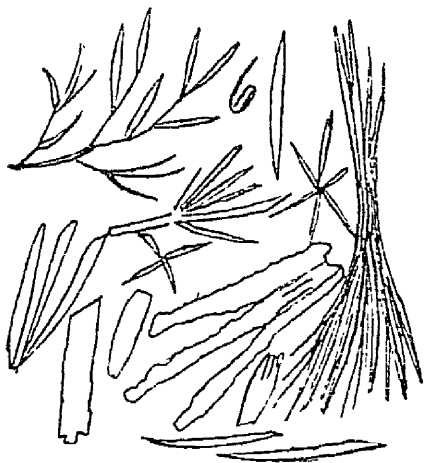



Fig. 108. Alkaloidkristalle aus Schnitten der Colombo-Wurzel mit Salzsäure-Chloroform (Tunmann)

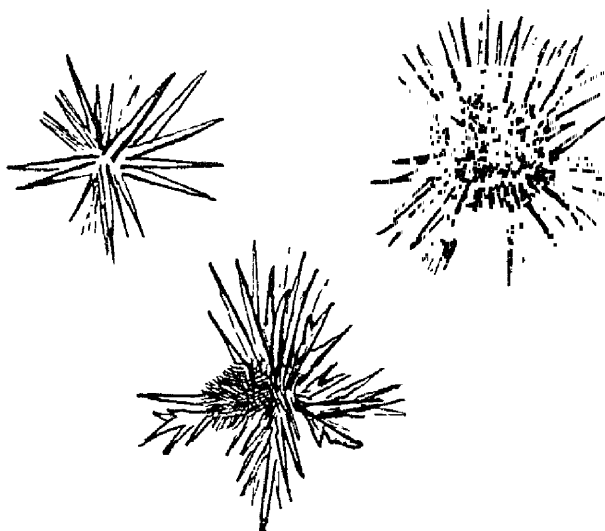



Fig. 109. Kristalle aus der Wurzel von Jatrorrhiza Calumba mit Diammino-tetranitrito-kobalti-Kalium (gez. Großglauser)

Zur Sichtbarmachung der Alkaloide empfahl Tunmann[1]) folgende Verfahren:

1. Zu drei bis vier größeren unter Deckglas liegenden Trockenschnitten fügt man Weingeist und einen kleinen Tropfen Jodjodkaliumlösung (oder mit Weingeist verdünnte Jodtinktur). Das Eindringen der Lösung wird durch mehrmaliges Heben des Deckglases erleichtert. Nach dem Verdunsten des Weingeistes scheiden sich kleinkörnige, orangegelbe Massen ab (Jodid des Columbamins Feist = Palmatin Späth) und außerdem bis 10 μ große dunkelrote sphärokristallinische Gebilde (Jodid des Jatrorrhizins). Sie sind in Wasser und Glyzerin unlöslich, in Chloralhydrat löslich und vereinigen sich zu größeren

[1]) O. Tunmann, Über die Calumba-Wurzel, Pharmazeut. Zentralh. 1914, LV, S. 775.

rundlichen Gruppen oder zu langen Faserkristallen; seltener entstehen sternförmig gruppierte kleine Nädelchen.

2. Zwei bis drei größere Trockenschnitte werden auf dem Objektträger mit einem kleinen Tropfen starker Salzsäure betupft und nachdem sich die Schnitte glatt gerollt haben, mit dem Deckglas bedeckt. Nach wenigen Augenblicken, vornehmlich nach gelindem Erwärmen, sieht man in der Nähe der Schnitte Kristalle anschießen und zwar bilden sich kleinere oft zu Sternen, Kreuzen oder Drusen vereinigte Nadeln, die bei durchfallendem Licht metallisch glänzend, fast schwarz erscheinen, sowie längere fahlgelbe und blaßblaue Nadeln und langgestreckte Blättchen. Man setzt nun Chloroform zu und bewirkt durch einseitiges Heben des Deckglases Mischen der Säure mit dem Chloroform. In den Chloroformtropfen erscheinen sofort sehr große orangefarbige Nadeln und Platten. Nach der Verdunstung des Chloroforms ist der Rand des Deckglases völlig mit Kristallen umgeben, die zum Teil zu Besen und strauchartigen Gebilden anwachsen, aber auch längere Platten bilden (Fig. 108).

Zur chemischen Charakterisierung der Colombowurzel behandelt Rosenthaler[1]) mit ammoniakalischem Chloroform im Reagenzglas. Man filtriert, dampft das Filtrat in kleinem Reagenzglas ab, nimmt den Rückstand mit 2 ccm $N/_{10}$-Salzsäure auf und konzentriert. Die so erhaltene gelbe Flüssigkeit zeigt folgende Reaktionen: 1. Auf Zusatz von Natriumnitrat entsteht ein gelber, bald in kleine Drusen übergehender Niederschlag. 2. Mit Kaliumjodid amorpher gelber Niederschlag. 3. Mit Jodsäure bildet sich ebenfalls ein gelber Niederschlag, der allmählich in kleine drusenartige Agreggate übergeht. 4. [Diammino-tetranitrito-kobalti]-Kalium läßt mannigfach verzweigte gelbe Nadelbüschel entstehen (Fig. 109).

Anamirta paniculata

Aus den Früchten (Kokkelskörner) hat Frank[2]) charakteristische Mikrosublimate erhalten. Alkaloidreaktionen gibt das Sublimat nicht. Die größeren Kristalle gehören zum Teil Fettsäuren an. Auch Picrotoxin kann zugegen sein (reines Picrotoxin gibt bei der Sublimation aber nur flüssige Kristalle).

Papaveraceae

Papaver

Von den zahlreichen Alkaloiden, die im Opium, dem durch Anritzen der unreifen Kapseln gewonnenen, eingetrockneten Milchsafte von Papaver somniferum, aufgefunden sind, kommen in größerer Menge vor: Morphin (10—14 %), Narcotin (4—8 %), Papaverin (bis 1 %), Codein (0,2—0,8 %), Thebain (0,2—0,5 %),

[1]) L. Rosenthaler, Chemische Charakterisierung von Drogen, Schweiz. Apoth.-Ztg., 1924, LXII, S. 142.

[2]) L. Frank, Praktische Anwendungen der Mikrosublimation, Zeitschr. Nahr.- und Genußm., 1903, VI, S. 880.

Narcein (bis 0,4 %). Die Menge des Milchsaftes und sein Alkaloidgehalt ist vom Klima weitgehend unabhängig, denn in Schweden oder Deutschland kann man ein ebenso gehaltreiches Opium gewinnen, wie in Kleinasien, China oder am Zambesi.

Von der Zeit der Blüte an nimmt der Alkaloidgehalt der Mohnpflanze und ganz besonders der der Kapseln rascher zu als vorher, fällt aber in letzteren bei zunehmender Reife der Samen ebenso rasch und beginnt erst dann, wenn die Samen halbreif sind, langsamer abzunehmen. Die reifen Samen enthalten nach A. Müller keine Alkaloide, nach Kerbosch Spuren von Narkotin und amorphe Alkaloide.

In den keimenden Samen ist schon nach drei Tagen eine bedeutende Menge Narkotin gebildet. Weiter bilden sich der Reihe nach: Kodein, Morphin, Papaverin, Thebain.

Längere Perioden trüben Wetters können den Alkaloidgehalt bis auf Spuren vermindern.

Morphin. Farblose, stark bitter schmeckende Prismen. F. 230°. Schwer in Wasser und Äther löslich, leichter in Weingeist, Azeton und Chloroform. Von den Farbenreaktionen ist die Formalin-Schwefelsäure-Reaktion (über purpur und violett blau) auch mikrochemisch verwendbar. Von den mikrochemischen Reaktionen hat sich die von Behrens bewährt: Auf Zusatz von Merkurichlorid und Kaliumbromid entsteht eine starke, bräunlich durchscheinende Trübung und in dieser bilden sich bald feinfaserige Pinsel und zierlich verzweigte Rosetten. Mit Chlorzinkjod entstehen anfangs feine hellbraune Nadeln, später Büschel und zuletzt Prismen (Tunmann).

Narkotin. Farb- und geschmacklose Nadeln. F. 176°. Unlöslich in Wasser, löslich in Weingeist, Äther, Essigäther und Chloroform.

Von den Farbenreaktionen ist die beim Erwärmen mit Arsensäure — Schwefelsäure eintretende — allerdings nicht völlig eindeutige — Rotfärbung auch mikrochemisch brauchbar.

Wagenaar[1]) gibt für eine Anzahl von mikrochemischen Morphin-Reak- [illegible]e an.

	Grenz-konzentration	Erfassungs-grenze
Merkurichlorid	1 : 1000	
Merkuribromid	1 : 10 000	0,1
Kaliumquecksilberjodid	1 : 10 000	0,1
Kadmiumchlorid	1 : 100	10
Kadmiumbromid	1 : 200	5
Kadmiumjodid	1 : 1000	1
Pikrolonsäure	1 : 1000	1
Alkalijodid	1 : 100	25
Alkalibromid	1 : 200	25
Jodjodkalium	1 : 200	5
Kaliumchromat	1 : 200	

[1]) M. Wagenaar, Microchemische reacties op Morphine, Pharmac. Weekbl., 1927, LXIV, S. 1119.

Der mikrochemische Nachweis des Morphins und Narkotins im Opium läßt sich folgendermaßen erbringen:

1. Legt man Opiumpulver in Ammoniakflüssigkeit, so treten alsbald kristallinische Gebilde, Körner und Sphärokristalle auf (Fig. 110). Übergießt man sie nach Verdunstung des Ammoniaks mit Formalin-Schwefelsäure, so färben sie sich violett. Sie enthalten also Morphin, falls sie nicht ausschließlich daraus bestehen[1]).

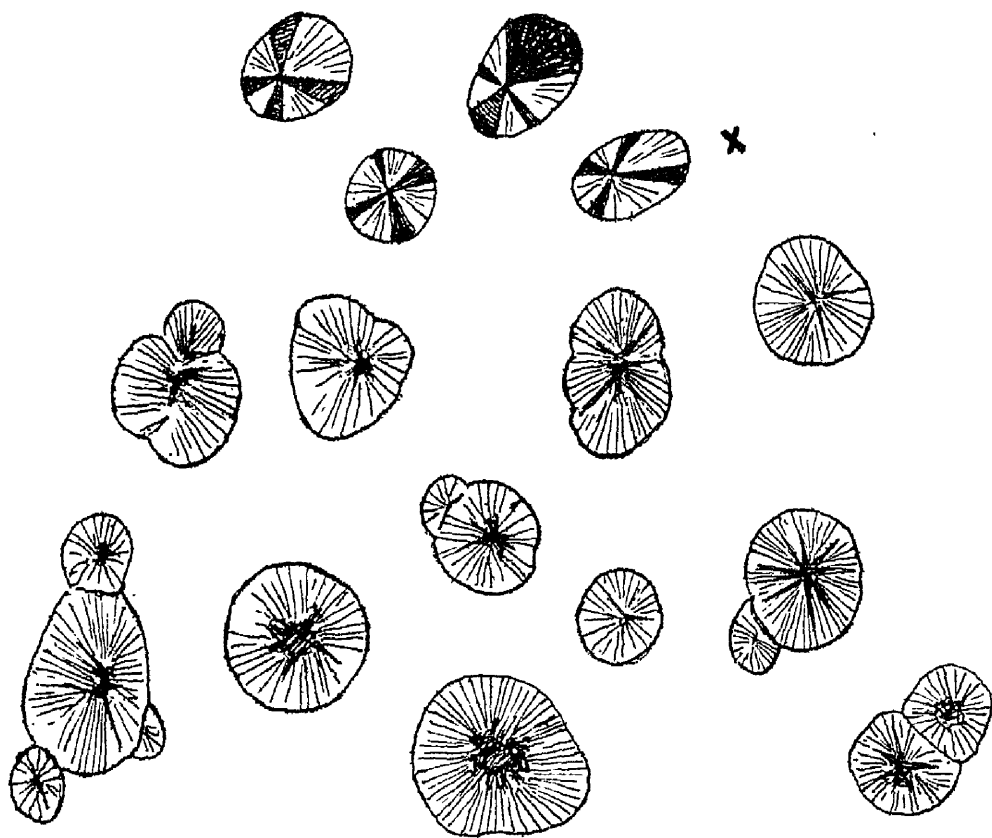



Fig. 110. Sphärokristalle aus Opium durch Ammoniak. Dieselben zwischen gekreuzten Nikols (gez. Stucki)

2. Man verreibt Opium mit ein wenig Wasser, zieht einen Tropfen der Lösung ab und läßt einen Tropfen Kalium-Quecksilberbromidlösung[2]) hinzutreten. Es bildet sich nach kurzer Zeit der oben geschilderte Niederschlag[3]) (Fig. 111).

[1]) L. Rosenthaler, Mikrochemischer Nachweis des Opiums, Schweiz. Apoth.-Ztg., 1920, LVIII, S. 313.

[2]) Eine Lösung von 2,5 g Quecksilberchlorid und 5,0 g Kaliumbromid in 50 g Wasser.

[3]) L. Rosenthaler, Chemische Charakterisierung von Drogen, Schweiz. Apoth.-Ztg., 1924, LXII, S. 142.

3. Man behandelt mit ammoniakalischem Chloroform auf dem Objektträger. Es entstehen zahlreiche Kristalle verschiedener Art, vorwiegend Prismen, aber auch Sphärokristalle und Stechäpfel. Die Kristallzone (Fig. 112) gibt die Formalin-Schwefelsäure-Reaktion (Morphin) und die Arsensäure-Schwefelsäure-Reaktion (Narkotin).

Zum Nachweis von Morphin in unreifen Mohnfrüchten durchschüttelt man deren Pulver im Reagenzglas mit ammoniakalischem Chloroform, filtriert, dampft ab, nimmt den Rückstand mit $N/_{10}$-Salzsäure auf und konzentriert auf 1—2 Tropfen. Setzt man dann Kaliumquecksilberbromid hinzu, so entstehen noch mit 0,1 g Früchten die oben erwähnten Kristalle. Dampft man die mit Salzsäure erhaltene Lösung zur Trockene und gibt zum Rückstand Formalin-Schwefelsäure, so tritt Violettfärbung noch bei Verwendung von 0,05 g Früchten ein.

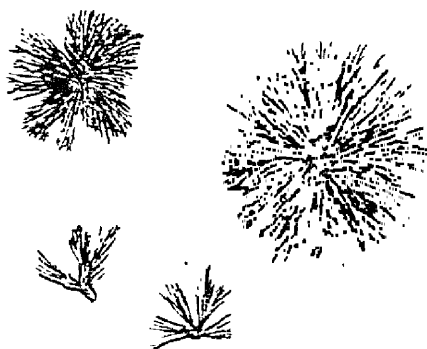



Fig. 111. Kristalle aus Opium mit Kalium-Quecksilberbromid (gez. Großglauser)

Die erste Untersuchung über die Lokalisation der Alkaloide in Papaver somniferum rührt von Clautriau[1]) her. Der Milchsaft gab mit Jodjodkalium, Jodwismutjodkalium, Jodkadmiumjodkalium, Jodquecksilberjodkalium, Phosphormolybdänsäure Fällungen, wurde mit Titan-Schwefelsäure (Titansäure 2,0, Schwefelsäure 98,0) rotbraun, mit

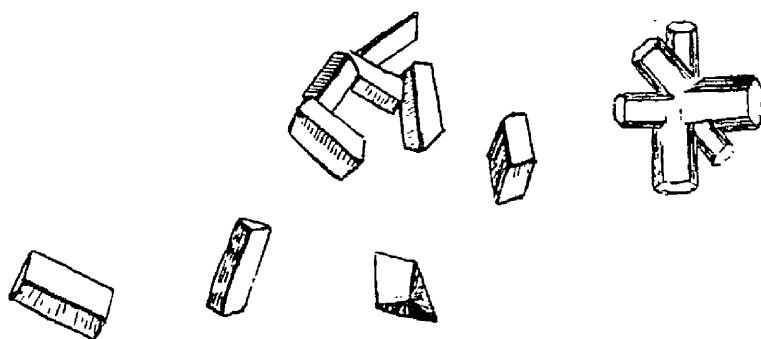



Fig. 112. Opiumalkaloide aus Opium mit ammoniakalischem Chloroform (gez. Großglauser)

Methylal-Schwefelsäure (5 Tropfen Methylal auf 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure) violett; er enthält also Morphin. Da Palladiumchlorür und Iridiumchlorür ebenfalls mit dem Milchsaft Niederschläge geben, so wird die Anwesenheit von Narkotin wahrscheinlich, zumal sich der Milchsaft mit einer Lösung von selensaurem Natron in Schwefelsäure in gleicher Weise rotorange färbt, wie Gemische aus

[1]) G. Clautriau, Rech. microchimiques sur la localisation des alcaloides dans le Papaver somniferum, Ann. Soc. Belge de Micr., 1889, XII, S. 67.

Morphin und Narkotin. Die bei Zusatz von Methylal-Schwefelsäure zunächst auftretende Gelbfärbung läßt auf die Anwesenheit von Narcein schließen.

Einen anderen Weg der Untersuchung, der allerdings nicht die Ermittelung der Lokalisation gestattet, wählte Kerbosch[1]. Die Alkaloide werden zunächst aus dem lufttrockenen Pflanzenpulver durch 3stündiges Schütteln mit der 5fachen Menge ammoniakalischer (pyridinfreies Ammoniak!) Chloroform-Alkohol-Mischung isoliert und gereinigt. Die Gesamtausschüttelungen werden vorsichtig eingedampft und der Rückstand mit 2 ccm 1proz. Salzsäure aufgenommen. In dieser Lösung werden nun die Hauptalkaloide mikrochemisch nachgewiesen und außerdem ihre Brechungsindices bestimmt. Aus saurer Lösung erfolgt bei Zusatz von Natriumazetat (gelinde Erwärmung) kristallinische Fällung von Narkotin. Der Lösungstropfen gelangt auf einen anderen Objektträger. Durch Erwärmen und Zusatz von Natriumazetat fällt zunächst der Rest von Narkotin aus, schließlich auch Papaverin. Eines der letzten Präparate wird mit einem Tropfen 1proz. Schwefelsäure und Caesiumkadmiumjodid versetzt; es fällt die kristallinische Papaverinverbindung aus. In Lösung bleiben Narcein und Thebain. Der Tropfen wird mit Natriumazetat versetzt, der Objektträger bleibt 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur liegen. Narcein kristallisiert aus (Blaufärbung mit Jod). Der abgezogene Lösungstropfen, mit Natriumkarbonat in geringem Überschuß versetzt und erwärmt, gibt kristallinisches Thebain. Mit Caesiumkadmiumjodid geben auch Kodein und Morphin charakteristische Kristalle, ersteres moosförmige Bildungen, letzteres sehr feine regellos angeordnete lange Nadeln. Außerdem eignet sich zur Unterscheidung von Kodein und Morphin die Reaktion mit Sublimat und Kaliumbromid nach Behrens[2].

Die Opiumalkaloide sind nach Clautriau lokalisiert: im Milchsaft, in der Epidermis der ganzen Pflanze, hauptsächlich in der Epidermis der Kapsel, ferner in den Haaren des Kapselstieles, nicht in den Wurzelhaaren; nach der Basis der Pflanze hin macht sich eine Abnahme an Alkaloiden in der Epidermis des Stengels bemerkbar. Mit Hilfe der gereinigten Alkaloidauszüge der verschiedenen Pflanzenteile konnte Kerbosch (a. a. O.) ermitteln, daß der Same eine Spur Narkotin enthält, die beim Keimen sofort stark zunimmt, und amorphes Alkaloid. Die blühende Pflanze führt in allen Teilen (Staubfäden ausgenommen) bis zur Reife Narkotin, Papaverin, Kodein, Morphin. In

[1]) M. Kerbosch, Bildung und Verbreitung einiger Alkaloide in Papaver somniferum L., Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 536.

[2]) H. Behrens, Mikrochemische Analyse organ. Verbindungen, Heft III.

den Blättern der Smyrnapflanze ist Narcein zugegen, das einheimischen Mohnsorten fehlt. Die reife Pflanze enthält in allen Organen Narkotin, Kodein, Morphin. Ersteres bildet sich im Samen auch beim Keimen im stickstofffreien Boden und findet sich in der Blütenknospe in weit größerer Menge als in der unreifen Samenkapsel.

Über die mikrochemische Unterscheidung von Morphin und Kodein siehe außerdem O. Tunmann, Apotheker-Ztg. 1926, XXXI, S. 148.

Chelidonium-Alkaloide[1])

Im Milchsaft von Chelidonium majus L. kommen mehrere Alkaloide vor, von denen Chelidonin, Homochelidonin, Allokryptopin, Chelerythrin, Sanguinarin und Protopin erwähnt seien.

Chelidonin. Glasglänzende monokline Tafeln oder Nadeln. F. 135—136°. Unlöslich in Wasser, löslich in Weingeist und Äther.

Homochelidonin. Farblose rhombische Kristalle (aus Essigäther). F. 181 bis 182°.

Allokryptopin. F. 159—160°.

Chelerythrin. Farblose Kristalle. F. (ohne Kristallalkohol) 263—264°. Schwer löslich in Weingeist, Äther und Essigäther, leicht in Chloroform. Die Lösungen, besonders der unreinen Base zeigen blaue Fluoreszenz. Salze gelb.

Sanguinarin. Farblose büschelig gruppierte Nadeln. F. 213°. Löslich in Weingeist, Äther, Chloroform. Die Lösungen, besonders des unreinen Alkaloids zeigen blauviolette Fluoreszenz. Salze blutrot.

Protopin. Durchscheinende glänzende monokline Prismen oder Warzen aus undurchsichtigen Nädelchen. F. 200—207°. Löslich in Chloroform, schwer in Weingeist, nicht in Wasser.

Die mikrochemischen Reaktionen seien nur von Sanguinarin und Chelerythrin angegeben, da sie bei den anderen Alkaloiden durch Beimengungen stark beeinflußt werden und somit im Gemisch anders ausfallen, als bei den reinen Alkaloiden.

Chelerythrin gibt mit den meisten Fällungsmitteln eigelbe feine oft schwach gebogene spitzendige Nadeln, die zu sehr verschiedenen Aggregaten, Stachelkugeln u. a. zusammentreten können. Pikrolonsäure bildet außerdem kurze Stäbchen und Sterne.

Sanguinarin. Mit Salzsäure schön orangerote, im auffallenden Licht blutrote Nadelsterne und Stachelkugeln.

Wird von dem Milchsaft der Wurzel — besonders geeignet im Spätherbst — ein Tropfen auf einen Objektträger abgedrückt und sofort mit dem Deckglas bedeckt, so treten darin bald zahlreiche rechteckige Täfelchen von Sanguinarin auf.

Die Salzsäurereaktion führt Kratzmann so aus, daß er aus der Doppelschnittwunde den Milchsaft auf einem Objektträger auffängt, daraus 3—5 Präparate macht und sie mit einem mit einem Tropfen

[1]) E. Kratzmann, Der mikrochemische Nachweis der Chelidonium-Alkaloide, Pharmaz. Monatsh., 1922, III, S. 45.

konzentrierter Salzsäure versehenen größeren Deckglas überdeckt, das man dann unter gelindem Druck ein wenig hin- und herreibt. Wenn alle Flüssigkeit bis auf eine schmale Zone am Rand verdunstet ist, fallen die schönsten Kristalle aus.

Um die Formen der im Milchsaft mit den Reagentien auftretenden Kristalle identifizieren zu können, hat Kratzmann eine Impfmethode ausgebildet. Ihr Wesen besteht „darin, daß zu genauest abgemessenen gleichen Mengen des Milchsaftes kleine Alkaloidzusätze beigegeben werden, die dann, beeinflußt von den übrigen Alkaloiden in bestimmter Kristallform ausfallen und zwar in weit größerer Zahl, als im ungeimpften Kontrollpräparat, wodurch Schlüsse auf die Zugehörigkeit gewisser Kristalle zu bestimmten Alkaloiden ermöglicht werden und andererseits Zusammenhänge zwischen dem Auftreten dieser Kristalle und dem Einfluß, den andere Alkaloide auf sie ausüben, deutlicher erkannt werden können“.

Ausführung: Der Milchsaft wird mit konzentrierter Essigsäure verrieben und mit dem Reagens, z. B. Pikrolonsäure versetzt. Man setzt noch Essigsäure hinzu, bis die Flüssigkeit fast klar ist und filtriert durch ein Mikrofilter.

Man stellt zunächst eine „Meßkapillare“ her. Auf eine gewöhnliche Glaskapillare[1]) setzt man oben eine Gummikappe von einer Pipette auf und bringt an der Kapillare etwa 5 cm von der Öffnung entfernt, eine Tuschmarke an. Man mißt mit dieser Meßkapillare wie mit einer Pipette.

Nun legt man ein kleines, etwas zusammengedrehtes Wattebäuschchen in den präparierten Milchsaft, setzt die Spitze der Kapillare mit leichtem Druck inmitten der Watte ein und saugt auf. In die Kapillare steigt die Flüssigkeit klar auf. Man entleert sie in ein Uhrschälchen und filtriert auf diese Weise allen Saft. Man mischt, indem man einige Male die Flüssigkeit aufsaugt und sie wieder zurücklaufen läßt.

Man verteilt von dieser Stammflüssigkeit „auf eine Reihe von Objektträgern ganz gleiche Tropfen, setzt neben jeden ein kleines Tröpfchen der Impfsubstanz, vereinigt beide Tropfen durch sanftes Neigen des Objektträgers und mischt sie durch leises Schwenken, wobei man darauf achtet, daß die Tropfen nicht zu weit auseinander fließen, legt dann die Deckgläser auf (alle gleich groß). Außerdem hat man ein oder mehrere Kontrollpräparate angesetzt, die ohne Impfung bleiben. Dann läßt man die Präparate langsam eindunsten“.

---

[1]) Eine 3—4 mm im Lichten messende Glasröhre wird in der Bunsenflamme erhitzt und nach dem Erweichen in der Mitte zu einer höchstens ½—1 mm Durchmesser haltenden Kapillare ausgezogen. Man verwendet ein 5 cm langes Stück der Glasröhre mit etwa 10—12 cm der Kapillare daran. Für jede Substanz wird eine eigene durch Etikette bezeichnete Kapillare gebraucht.

Mängel der Impfmethode liegen, wie Kratzmann selbst festgestellt hat, u. a. darin, daß durch den Zusatz eines Stoffes die Mischungsverhältnisse verschoben werden, und daß auch ein Zusatz eines fremden Stoffes einen nicht vorauszusehenden Einfluß auf das System ausüben kann. So zeigte es sich z. B., daß eine bestimmte, zu Allokryptopin gehörige, in Gegenwart von Chelerythrin ausfallende Kristallform bei Gegenwart von Chelidonin besonders schön auftritt, daß aber das Chelidonin auch durch Chinin ersetzt werden kann.

Das Allokryptopin-Pikrolonat bildet unter diesen Umständen dicke, pfriemenförmige Nadeln.

Chelidonin und Protopin werden mit Salzsäure nachgewiesen. Ersteres bildet Rhomben, Kugeln und aus ganz feinen Nadeln oder Platten bestehende Sphärite.

Protopin + Allokryptopin bilden lange farblose pfriemenförmige Nadeln in Garben und Doppelbüscheln, die immer nur dann auftreten, wenn die Flüssigkeit schon stark verdunstet ist.

Die wichtigsten von Kratzmann[1]) erhaltenen Ergebnisse sind die folgenden: Sanguinarin. Ist in großer Menge stets nur in der Wurzel anzutreffen. Die oberen Stammteile sind bis zum Beginn des Blühens davon frei. Erst wenn sich die Fruchtbildung vorbereitet, steigt es in den Stamm, und zwar in größeren Mengen zuerst nur in die fruktifizierenden Äste. Ganz junge Früchte und die Samen enthalten keines, ältere in den Fruchtwandungen viel, reife wenig. In den Blättern, besonders den grundständigen, findet es sich nur bisweilen im Hochsommer. Im Herbst sammelt es sich wieder in der Wurzel.

Chelidonin. In großer Menge nur in der Wurzel, selten in jungen Früchten, sonst nirgends.

Chelerythrin. Überall. In besonders großer Menge in der Blattspreite jüngerer Blätter, sowie in Knospen- und Blütenstielen, wo es die Hauptmasse der Alkaloide bildet.

Protopin, Allokryptopin und Homochelidonin sind in der ganzen Pflanze in größerer Menge vorhanden, besonders viel in der Herbstwurzel. Die ersten Alkaloide, Chelerythrin und die zuletzt genannten, treten im etwa 4 cm langen Keimlingen an der Übergangsstelle von Wurzel und Samen auf.

Kelch- und Blumenblätter, Staubgefäße und Samen sind frei von Alkaloiden.

[1]) E. Kratzmann, Mikrochemische Studien über den Milchsaft von Chelidonium majus, Pharmaz. Monatsh., 1924, V, S. 161.

Sanguinaria

In der Wurzel von Sanguinaria canadensis sind nach Kozniewski[1]) fünf Alkaloide: Protopin, β-Homochelidonin, Allokryptopin, die farblose Salze geben, ferner Sanguinarin[2]), das überwiegend als glykosidischer Körper (?) auftritt, welcher die rote Färbung hervorruft, und Chelerythrin, eine violette Base, die rote Salze liefert.

Mikrochemisch sind bei der Extraktion des Wurzelpulvers mit Schwefel- oder Petroläther, Schwefelkohlenstoff, Chloroform und Azeton Kristalle zu erhalten, die sich aber zur Charakterisierung nicht eignen sollen. In Schnitten rufen Schwefelsäure und jodhaltiger Schwefelkohlenstoff Bildung von Sphärokristallen und Nädelchen hervor.

Fumariaceae

Zopf[3]) und Heinricher[4]) fanden in zahlreichen Fumariaceen idioblastische Elemente, die ersterer als „Gerbstoff- und Anthocyanbehälter" bezeichnete, während letzterer darauf hinwies, daß der Inhalt dieser Zellen (Schlauchzellen) mit Jodjodkalium oder weingeistiger Jodlösung einen braunen Niederschlag gibt, welcher sich ziemlich schnell wieder auflöst. Die Reaktion käme nicht einem „Gerbstoffe" zu. Léger (Compt. rend., 1890) spricht von Milchbehältern. Zopf[5]) selbst hat dann später erkannt, wenigstens bei Corydalis-Arten, daß der Inhalt der Idioblasten mit Ammoniak (dunkelgrauer körniger N.), Pikrinsäure, Phosphormolybdänsäure (gelber N.) und mit Jodjodkalium (rotbrauner N.) reagiert. Niederschläge geben Goldchlorid, Platinchlorid, Kaliumdichromat. In der Tat kommen, wie wir durch Gadamer wissen, in den Corydalisknollen eine große Anzahl von Alkaloiden vor, in denen von Corydalis cava die Bulbocapnin-, Corydalin- und Corycavin-Gruppe.

Goris[6]) hat die Angaben von Zopf bei Corydalis lutea D. C. nachgeprüft und findet sie durchaus bestätigt. Die Milchsaftbehälter der Wurzel, des Stengels und des Blattstiels enthalten Alkaloide. In der

[1]) T. Kozniewski, Beiträge zur Kenntnis der Alkaloide aus den Wurzeln von Sanguinaria canadensis, Bull. Ac. de Cracovie, 1910, S. 235. Ref. Bot. Zentralbl., 1911, CXVI, S. 77.

[2]) Über die Mikrochemie von Protopin, Allokryptopin und Sanguinarin siehe das Vorhergehende.

[3]) W. Zopf, Über die Gerbstoff- und Anthocyanbehälter der Fumariaceen und einiger anderer Pflanzen, Biblioth. botan., 1886.

[4]) E. Heinricher, Vorläufige Mitteilung über die Schlauchzellen der Fumariaceen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1887, V, S. 233.

[5]) W. Zopf, Zur physiologischen Bedeutung der Fumariaceen-Behälter, Ber. d. bot. Ges., 1891, IX, S. 115.

[6]) Goris, Localisation usw. S. 91.

Wurzel sind es außerdem einige Zellen des Rindenparenchyms und Siebparenchyms, in denen mit Jodjodkalium eine Fällung eintritt.

Cruciferae

Brassica und Sinapis

Sinapin, der leicht zersetzliche Cholinester der Sinapinsäure (Gadamer), findet sich als saures, schwefelsaures Salz im Samen von Brassica nigra und Turritis glabra, sowie in glykosidischer Bindung (Sinalbin) im Samen von Sinapis alba.

Molisch (Histochemie) schlug zum mikrochemischen Nachweis des Sinapins konzentrierte Kalilauge vor; die Präparate werden gelb, beim Erwärmen chromgelb. Die Reaktion, die sich übrigens auch mit anderen Alkalien (Kalkwasser, Ammoniak) ausführen läßt, kommt auch dem Sinalbin zu, welches sich bei der Hydrolyse in Traubenzucker, Sinalbinsenföl und saures schwefelsaures Sinapin spaltet.

Euphorbiaceae

Ricinin[1])

Das Ricinin (Tuson 1864) kommt in Ricinus communis und R. zanzibarensis vor.

Kurze Prismen (aus Alkohol-Äther) Nadeln (neben Zerrformen) (aus Wasser). F. 200—201°. Auch in Weingeist, Methanol und Azeton löslich.

Leicht sublimierbar. Das Sublimat (im Kleinschen Mikrosublimationsapparat 11 mm Druck 175—180°) besteht aus stäbchenförmigen Kristallen und vier- bis sechsseitigen Blättchen. Sublimiert man im Ring auf der Asbestplatte, so erhält man sehr kleine Kristalle.

Die brauchbarsten Reagentien sind Kaliumauribromid („Goldbromid"), eine 5proz. Lösung von Goldchlorid und Kaliumbromid und Jodwasser (kalt gesättigte Lösung).

Goldbromid gibt eine Fällung von gelben bis rotbraunen Fäden (Erfassungsgrenze 2,5 γ) (Fig. 114), Jodwasser gibt mit konzentrierter Ricininlösung gelbe Nadeln oder haarförmige Kristalle, mit verdünnter feine violette Haarbüschel (Erfassungsgrenze 10 γ).

Die Reaktionsprodukte bilden sich erst beim Abdunsten des Lösungsmittels. Der Nachweis kann im Chloroform-Ammoniak-Auszug, im Sublimat oder im Schnitt, weniger gut im wässerigen Extrakt erbracht werden.

Um das Ricinin aus dem Samen, dessen Fett stört, zu sublimieren, verreibt man den Samen mit etwas Ammonkarbonat und ungefähr gleichviel „Pb_2O_3" und sublimiert ca. 1½ Stunden (im Kleinschen

[1]) G. Klein u. H. Bartosch, Der Nachweis von Ricinin, Österr. bot. Zeitschr., 1928, LXXVII, S. 241.

Apparat). Auch auf der Asbestplatte kann man so sublimieren. Fetthaltigen Extrakten setzt man vor der Sublimation Bleiazetat zu.

Im Samen ist am wenigsten Ricinin, beim Keimen (im Warmhaus bei künstlicher Beleuchtung) nimmt seine Menge erst zu, dann wieder

Fig. 114. Ricininauribromid (Klein u. Bartosch)

ab. In Wurzel, Stamm und Blattstiel ist wenig, im Blatt reichlich. Zur Blütezeit sinkt der Gehalt auch in Blatt und Blütenschaft auf ein Minimum, erreicht dagegen in den Blüten selbst ein Maximum. Im Samen sinkt er während des Reifens.

Zygophyllaceae

Peganum harmala

Die kleinen Samen der Steppenraute Peganum harmala enthalten die Alkaloide Harmalin und Harmin. Letzteres erwies sich als identisch mit dem Jagein aus der südamerikanischen Malpighiacee Banisteria Caapi Spruce, auch als Banisterin bezeichnet.

Harmalin. Farblose rhombische Kristalle. F. 238⁰. Schwer löslich in kaltem Wasser, Weingeist und Äther, leicht in siedendem Weingeist. Die Salze sind gelb.

Harmin. Farblose glänzende rhombische Prismen. Löslichkeit wie Harmalin. F. 256—257⁰. Salze farblos oder schwach gelb. Nitrat und Perchlorat sind schwerlöslich. Villalba[1]) gibt für sein Jagein folgende Reaktionen an: Die weingeistige Lösung gibt mit Goldchlorid auf Zusatz von Wasser gelbe Nadeln. Die wässerige Lösung gibt mit Goldchlorid gelben, mit Froehdes Reagens weißen himmelblau werdenden Niederschlag. Mit Dragendorffs Reagens Nadeln, mit Erdmanns Reagens grüne, nach 24 Stunden rote Färbung. Mit Scheiblers Reagens fleischfarbenen Niederschlag.

Die Untersuchungen von Barth (Lit. S. 439, 6) haben ergeben, daß die Harmala-Alkaloide sehr leicht nachweisbar sind, da sie in großer Menge auftreten und gut kristallisierende Salze bilden. In den alkaloidhaltigen Zellen lassen sich Reaktionen erzielen mit: Jodreagentien (brauner kristallinischer Niederschlag, mit Chlorzinkjod haarförmige Kristalle). Platinchlorid, Goldchlorid (Kristalle), Kaliumdichromat (tafelförmige Kristalle), Salzsäure und Salpetersäure (in Substanz oder als Dampf angewandt, Kristalle), Pikrinsäure, Ferro- und Ferricyankalium, Rhodankalium, Natronlauge, Ammoniak (Bildung von Klumpen, deren Ränder zum Teil kleine Kriställchen zeigen), Bromwasser und Bromdämpfe (feine Kriställchen). An mit Weinsäure-Alkohol alkaloidfrei gemachten Präparaten bleiben die Reaktionen aus.

Die Alkaloide finden sich nur in der Samenschale und zwar sind sie auf die innere großlumige Zellreihe beschränkt, welche der obliterierten Nährschicht, die das Endosperm bedeckt, außen anliegt.

Papilionaceae

Cytisin

Cytisin (Chevalier und Lassaigne 1818) bildet rhombisch-hemiedrische Kristalle, F. 152—153⁰, die sich leicht in Wasser, Weingeist, Chloroform, schwerer in Äther, Benzol, Azeton lösen. Die Salze kristallisieren leicht und werden mit Ferrichlorid blutrot. Das Alkaloid ist für Cytisus-, Genista-, Sophora-, Thermopsis-Arten typisch. Es findet sich in Cytisus Laburnum und anderen Cytisus-Arten (s. unten), Laburnum alpinum, Ulex europaeus, Baptisia tinctoria, B. australis, Sophora speciosa, S. tomentosa, S. secundiflora, Anagyris foetida, Euchresta Horsfieldii, Lotus suaveolens, Colutea orientalis. Plugge[2]) hat die bis 1895 als cytisinhaltig bekannten Pflanzen makrochemisch nachgeprüft und zusammengestellt.

Klein und Farkass fanden Cytisin mit ihrem mikrochemischen Verfahren in Cytisus leiocarpus (Blüte), Cytisus multiflorus (Blüte),

---

[1]) Nach Chem. Zentralbl., 1925, II, S. 1176.

[2]) P. C. Plugge, Über das Vorkommen von Cytisin in verschiedenen Papilionaceen, Arch. d. Pharm., 1895, CCXXXIII, S. 430.

Cytisus versicolor (Spuren im Stamm), Genista radiata (Spuren im Blatt), Genista pilosa (Spuren im Blatt und Stiel), Retama retam (Spuren im Stiel). Sophora alopecuroides (Blatt und Stamm), Sophora arborea (Blatt und Stamm), Sophora flavescens (Stamm), Sophora japonica (Stamm), Baptisia tinctoria (Wurzel), Baptisia exaltata (Blatt und Stamm), Baptisia australis (Blatt und Stamm), Baptisia leucantha (Blatt und Stamm), B. tinctoria (Wurzel). Auf Grund der mikrochemischen Reaktionen verneinen sie die Identität von Cytisin und Ulexin.

(G. Klein und E. Farkass. Der mikrochemische Nachweis der Alkaloide in der Pflanze. XIV. Der Nachweis von Cytisin, Österr. Bot. Ztschr. 1930, LXXIX, S. 107).

Reifer Samen von Cytisus Laburnum hat 1,5, von Ulex europaeus nach Leprince und Monnier (1909) bis zu 2,55 % Cytisin. Wijsman[1]) spricht das Cytisin für eine Substanz an, die sich an der Bildung der neuen Gewebe beteiligt, für eine Vorstufe der Eiweißkörper. Nach Guérin findet in der Kultur bei Lichtabschluß keine Abnahme statt.

Die charakteristische Farbenreaktion des Cytisins (Rotfärbung mit Ferrisalzen, verschwindet mit Wasserstoffperoxyd, dann erwärmt blau) ist nur im ersten Teil mikrochemisch verwendet worden.

Rosoll[2]) benutzte zum Nachweis des Cytisins im Gewebe nachstehende Reagentien: Jodjodkalium (bräunliche Färbung, schließlich rotbrauner Niederschlag, der sich in Natriumhyposulfit löst), Pikrinsäure (rotgelbe Kristallschuppen), Schwefelsäure (rötlichgelbe Streifen fließen ab, bei Zusatz eines Körnchen Kaliumdichromat wird die Lösung gelb, langsam braun, schließlich grün), Phosphormolybdänsäure (gelbe Trübung). Guérin[3]) bediente sich der gleichen Reagentien (mit Ausnahme der Schwefelsäure) und zog außerdem heran: Jodwismutjodkalium (rötlichbrauner N.), Jodquecksilberjodkalium (weißgelber N.), sowie Bromwasser (gelbe Fällung). In späterer Zeit hat sich Boelling (S. 25 der auf S. 459, 1 gen. Diss.) nochmals mit dem Cytisinnachweis beschäftigt und empfiehlt als Reagentien: Jodjodkalium und Chlorzinkjod (brauner amorpher N.), Kaliumwismutjodid (zinnoberrote Fällung), Phosphorwolframsäure, Kaliumkadmiumjodid, vor allem aber Goldchlorid (nach einigen Stunden sternförmige Kristalle, bei Nachprüfung

---

[1]) H. P. Wijsman, Über das physiologische Verhalten des Cytisins im Goldregen, Pharm. Weekbl., 1901, XXXVIII, Nr. 15.

[2]) A. Rosoll, Über d. mikrochem. Nachweis d. Glykos. u. Alkaloid. in d. vegetab. Geweben, 25. Jahresber., Gymnas. Stockerau, 1889—90, S. 24 u. Bot. Centralbl., 1890, XLIC, S. 44.

[3]) P. Guérin, Rech. sur la localisation de l'anagyrine et de la cytisine, Bull. d. la Soc. bot. de France, 1895, XLII, S. 430.

von Tunmann nicht erhalten) und Salpetersäure in Dampfform (kleine rhombische Tafeln). Wijsman, der das Alkaloid vorzugsweise mit Jodjodkalium nachweist, ist der Ansicht, daß sich dasselbe nicht aus den Geweben mit Weinsäure-Alkohol entfernen läßt, und schließt aus diesem Verhalten, daß Cytisin im pflanzlichen Gewebe in verschiedener Weise gebunden sein muß.

Zur Prüfung auf Cytisin ziehen Klein und Farkass 0,2 g trockenes Material eine Stunde mit 5 ccm Chloroform-Ammoniak (9:1) aus. Dessen Abdampfrückstand wird mit 5 ccm Wasser aufgenommen und je 1 ccm mit den folgenden Reagentien geprüft (Beurteilung nach 5—6 Stunden).

Platinbromid: Gelborange Sterne. Auslöschung gerade (1:100000).

Platinjodid: Schwarze Sterne (1:40000).

Kaliumtrijodid nach Berthaumé: Tiefbraune aus Prismen zusammengesetzte Sterne, in den höheren Verdünnungen einzelne Prismen. Auslöschung gerade (1:100000).

Goldbromid: Dunkelorange Nadeln. Auslöschung gerade (1:20000).

Pikrinsäure: Feine gelbe Nadeln (1:100000).

Über die Verteilung der Cytisins in Cytisus laburnum haben Klein und Farkass folgendes festgestellt: Die Nebenwurzeln führen weniger Alkaloid als die Hauptwurzel. Im Holz älterer Bäume findet man im Winter Spuren von Cytisin, sonst nicht. In Holz und Rinde einer drei Monate alten Pflanze wurde kein Cytisin gefunden. In der Rinde von Sonnenpflanzen findet man mehr Alkaloid als in der von Schattenpflanzen; das Periderm ist alkaloidfrei, die Blattspreiten von Schattenpflanzen sind alkaloidreicher als die von Sonnenpflanzen, der Blattstiel ist alkaloidfrei. Die Blumenblätter sind reich an Cytisin, die Kelchblätter enthalten davon mehr als die reichsten Laubblätter. Das Alkaloid verschwindet in den ersten Tagen der Keimung völlig und steigt dann von der ersten bis sechsten Woche an.

Die Lokalisation des Cytisins ist nach Guérin und Rosoll in Cytisus Laburnum die folgende:

Stengel: Im ganzen Rindenparenchym, am reichlichsten in den unmittelbar unter dem Kork liegenden Schichten, in den Markstrahlen und dem Siebteil.

Blatt: In den Epidermzellen, sowohl der Blattfläche wie des Mittelnerven, in letzterem auch im Parenchym, im Siebteil und den Markstrahlen.

Blüte: Der Kelch führt Alkaloid in den beiden Epidermen, stärker in der äußeren und dem Parenchym; ähnlich die Korolle. Viel Alkaloid in den Karpellblättern. Die Pollenmutterzelle führt Cytisin, das reife Pollenkorn nicht.

Frucht: Die junge Hülse enthält in Mesokarp und Epikarp reichlich Alkaloid. Später findet man es nicht mehr im Epikarp, im Mesokarp häuft es sich um die zum Ovulum führenden Gefäßbündel.

Samen: In den Frühstadien sind Samenschale, Endosperm und Keimling alkaloidhaltig, im reifen Samen nur noch der letztere. Das Alkaloid findet sich in den äußeren Teilen angehäuft.

Guérin hat noch die Lokalisation studiert in Cytisus alpinus Lam., C. sessilifolius L., C. capitatus Scop., C. purpureus Scop., C. monspessulanus L., C. Adami Poit., C. hirsutus L., C. Alschingeri Vis. und C. Weldeni Vis.

Im Stengel von Cytisus Laburnum ist das Alkaloid von einem Tannid begleitet (Rosenthaler und Mosimann).

In den Samen von Cytisus hirsutus L. fand Grogg mit den allgemeinen Alkaloidreagentien Alkaloid in allen Teilen des Samens, wahrscheinlich auch in den Palisadenzellen.

Die Lokalisation während der Keimung der Cytisus-Samen verfolgte Boelling und bald darauf van Gulick[1]). Alkaloidhaltig sind: im Samen die Kotyledonarzellen und das Würzelchen, das ganze Gewebe des jungen Keimlings, Epidermis und primäre Rinde des Hypokotyls, die gleichen Gewebe des Stengels in älteren Pflänzchen und sämtliche Gewebe des jugendlichen Blattes. Diese Resultate stimmen im wesentlichen mit denen von Wijsman überein, der noch auf die Abnahme des Alkaloidgehaltes der Samen beim Keimen aufmerksam macht.

Nach van Dyck[2]) verminderte sich während der Keimung der Alkaloidgehalt der Kotyledonen, während er in dem Hypokotyl und der jungen Wurzel zunimmt.

Anagyrin

Anagyrin (Hardy u. Gallois 1885, Partheil u. Spasski 1895) begleitet Cytisin in Anagyris foetida, bildet eine dickflüssige Masse, die sich leicht in Wasser, Chloroform und Weingeist löst und gut kristallierende Salze gibt. Es ist eine tertiäre, curareähnlich wirkende Base, die in salzsaurer Lösung von Quecksilberchlorid gefällt wird und so von Cytisin getrennt werden kann.

Anagyrin wies Guérin (a. a. O.) in gleicher Weise wie Cytisin nach. Es gibt mit Ferrichlorid eine blutrote (in der Pflanze orange) Färbung, die sich besonders zu Lokalisationsstudien eignet.

Lokalisation:

[1]) H. van Gulick, De physiologische beteekenis van het alkaloid in den Goudenregen, Proefschrift, Leiden, 1901.

[2]) van Dyck, Phytochemische onderzoekingen over alkaloiden in verband met het kiemen, Proefschrift, Utrecht, 1900.

Wurzel: In der Wurzel des Keimpflänzchens in allen Teilen mit Ausnahme der Gefäßbündel und der Fasern, in der älteren Wurzel sind besonders die 4 bis 5 äußersten Schichten reich an Alkaloid; es findet sich außerdem noch in dem Siebteil und in den Markstrahlen.

Stengel: Im hypokotylen Teil des jungen Stengelchens findet sich viel Alkaloid in der Epidermis, im Rindenparenchym, dem Mark, vorzugsweise in den dem Holz benachbarten Zellen und einigen Elementen des Siebteils; im epikotylen Teil außerdem in den Haaren. Im älteren Stengel fehlt das Alkaloid im Mark; es ist reichlich in der Epidermis, dem Rindenparenchym, dem Siebteil und den Markstrahlen, nach Bildung des Phelloderms auch in diesem. Vegetationspunkt, Achselknospen und Haare sind reich an Anagyrin.

Blatt: Im Mittelnerv ähnlich wie im jungen Stengel. Viel Alkaloid findet sich in der Blattfläche des jungen Blattes in allen Palisaden- und Schwammparenchymzellen, am meisten aber in den Epidermen. In den alten Haaren ist es verschwunden.

Blüte: In der Epidermis und einigen Parenchymzellen des Kelches; in der äußeren Epidermis der Blumenblätter. Die innere Epidermis und die Parenchymzellen enthalten nur Spuren.

Samen: Kotyledonen und Würzelchen enthalten Alkaloid; in der Samenschale höchstens Spuren.

Lupinen-Alkaloide

In den Lupinen-Arten kommen (außer dem auch in Lupinus luteus vorkommenden Spartein s. S. 488) mehrere Alkaloide vor. Die wichtigsten sind das Lupanin und das Lupinin. Das Verhalten bei der Keimung ist zuerst von van Dyck, später von Sabalitschka und Jungermann[1]) studiert worden. Die nach zwei Wochen in Wurzel, Hypokotyl, Keimblättern und Sproß vorhandene Alkaloidmenge beträgt nur 80 % der in den Samen vorhanden gewesenen. Ganz verschwindet das Alkaloid auch aus den zusammengeschrumpften und abfallenden Keimblättern nicht. Der Entzug des Lichtes hat nach denselben Autoren eine Erniedrigung des absoluten Alkaloidgehaltes gegenüber normalen, im Tageslicht sich befindenden, Pflanzen zur Folge.

Da ein mikrochemischer Nachweis der einzelnen Basen nicht möglich ist, so ist vorläufig über den Anteil der einzelnen Basen an den Lokalisationsreaktionen nichts zu sagen.

[1]) Th. Sabalitschka u. C. Jungermann, Der absolute und prozentuale Alkaloidgehalt der einzelnen Teile von Lupinus luteus L. während der Vegetation. Biochem. Zeitschr., 1925, CLXIII, S. 445.

Dieselben, Einfluß des Lichtes auf den Alkaloidgehalt von Lupinus luteus L. Biochem. Zeitschr. 1925, CLXIV, S. 279.

Jacquemin benutzte zum Nachweis die allgemeinen Reagentien. Im Samen waren die Integumente (und die Samenschale) alkaloidfrei. Die Alkaloide fanden sich im Hypokotyl (Epidermis, Rindenparenchym, äußeres Mark, Spuren im Siebteil), im Blattstiel (Epidermis, zuweilen auch subepidermal, Siebteil, Mark), im Blatt (Epidermis, besonders unterseits, Nervenparenchym, Phloem, wahrscheinlich auch im Schwammparenchym), in allen Teilen der Blüte (vorzüglich in der Epidermis, weniger im Parenchym).

Frische (nicht alte) Samen von Lupinus albus geben ein kristallinisches Sublimat von Alkaloid (A. Niethammer, Biochem. Ztschr. 1930, CCXX, S. 356).

Spartein (Lupinidin)

Das Spartein, 1851 von Stenhouse aus Sarothamnus scoparius Koch dargestellt, findet sich auch in den Samen von Lupinus luteus und niger.

Farbloses Öl Kp. 311—311,5° (723 mm). Schwer in Wasser, leicht in Weingeist, Äther und Chloroform löslich, unlöslich in Benzol und Ligroin. Mit Wasserdämpfen flüchtig.

Tunmann[1]) macht Angaben über die mikrochemischen Reaktionen des Sparteins (Fig. 115). Er empfiehlt für Mengen von 0,3—0,5 mg Reaktionen mit verdünnter Chromsäure, Chlorzinklösung und Kupferchlorid, für geringere Mengen (30—5 μ) Quecksilberchlorid + verdünnte Salzsäure, Jodwasserstoffsäure (oder Jodjodkaliumlösung) und Kaliumkadmiumbromid. Aus Sparteinsulfat entstehen mit Chlorzinkjod sofort feine gelbrote Kristallfäden, die an ihren Enden zu Büscheln und Pinseln auswachsen. Alle Kristalle leuchten kräftig im polarisierten Licht, löschen parallel zur Längsachse aus und sind sehr stark pleochroitisch (von Blauschwarz bis zur Farblosigkeit).

Nach J. Chevalier (Compt. rend., 1910) nimmt der Sparteingehalt in der ersten Zeit zu, um zur Blütezeit und während der Fruchtbildung abzunehmen. In der Frucht häuft sich die Base in großen Mengen an (1 kg = 10 g Sparteinsulfat). Im Herbst findet eine, wenn auch geringere Zunahme wie im Frühling statt. 1 kg getrocknete Pflanzen ergeben 3,25 (April) bis 6,80 g (März) Sparteinsulfat.

Audemard[2]) hat die Lokalisation in Sarothamnus scoparius mit Hilfe von Jodjodkalium, Kaliumquecksilberjodid und Phosphormolybdänsäure studiert. Man kann ferner die Schwerlöslichkeit des Sparteinsulfats benutzen. Es bildet sich, allerdings nur langsam, wenn man die Schnitte in 5proz. Schwefelsäure bringt. Die Ergebnisse von Audemard wurden im wesentlichen von Jacquemin[3]) bestätigt.

[1]) O. Tunmann, Mikrochemische Sparteinreaktionen, Apoth.-Ztg., 1917, XXXII, S. 100.

[2]) A. Audemard, Recherches sur la localisation des alcaloides dans les Genêts, Th. Doct. Un. Pharm. Montpellier, 1902, 29.

[3]) A. Jacquemin, Sur la localisation des alcaloides dans les Légumineuses,

Wurzel: In den jungen Wurzeln ist das Alkaloid in den dem Zentralzylinder benachbarten Zellen des Rindenparenchyms und der

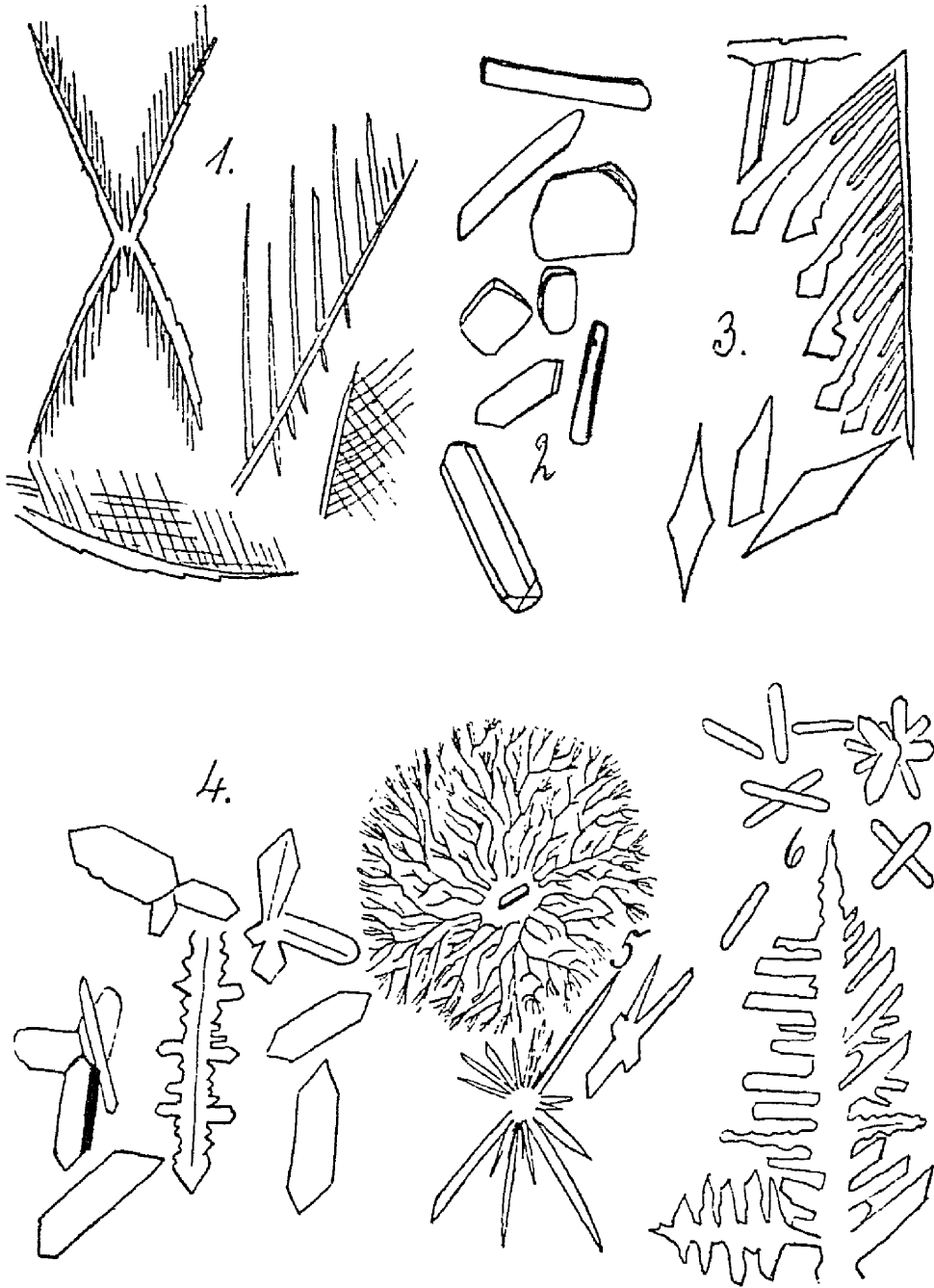



Fig. 115. Am Objektträger erhaltene Sparteinfällungen: 1. mit verdünnter Chromsäure, 2. mit Zinkchloridlösung, 3. mit Kupferchloridlösung, 4. mit Quecksilberchlorid und verdünnter Salzsäure, 5. mit Jodwasserstoffsäure, 6. mit Kaliumkadmiumbromid (Tunmann)

Endodermis. In älteren Wurzeln findet man es im Siebteil und einigen Zellen des äußeren Rindenparenchyms. Viel findet sich im Vegetationspunkt und den äußeren Teilen der Wurzelhaube.

Ann. soc. roy. des sciences med. et nat. Bruxelles, 1905, XIV, S. 41; Rec. Inst. bot. Errera, 1906, VI, S. 257.

Stengel. In jungen Stengeln unter der Epidermis, im Rindenparenchym, Siebteil und Mark; aus letzteren verschwindet es beim Altern. Epidermis und subepidermale Schichten des Vegetationspunktes sind reich an Alkaloid.

Blüte. Im Kelch in den beiden Epidermen, besonders der inneren, in der Korolle — besonders der Fahne — in vielen Zellen der Epidermis und benachbarten Zellen.

Frucht. In den Epidermen der Hülsen, besonders der äußeren Epidermis und einigen Zellen in der Nähe der Gefäßbündel.

Samen. In den Kotyledonen, besonders in den Epidermen und unmittelbar benachbarten Zellen, analog im Würzelchen. Die Samenschale ist alkaloidfrei.

Ebenso ist nach Audemard die Lokalisation der Alkaloide in Spartium junceum L., Genista tinctoria L., Genista candicans L., Genista pilosa L., Retama monosperma Boiss., Retama sphaerocarpa Boiss.

Genista canariensis L., von Jacquemin studiert, enthält ebenfalls Alkaloid.

Ormosin

Die Base Ormosin, welche noch recht wenig erforscht ist und von Merck aus dem Samen der brasilianischen Papilionacee Ormosia dasycarpa isoliert wurde, findet sich nach Boelling (S. 43 der auf S. 459, 1 gen. Dissertat.) ebenfalls nur im Embryo. In den alkaloidhaltigen Zellen erzeugen Jodjodkalium, Chlorzinkjod, Kaliumwismutjodid rotbraune amorphe Niederschläge, Pikrinsäure, Gerbsäure, Bromwasser gelbe Fällungen, Kaliumkadmiumjodid, Kaliumplatincyanid weißliche Trübungen. Die hellgelbe Fällung, die Goldchlorid hervorruft, läßt sich durch Nachbehandlung der Schnitte mit Ferrosulfatlösung, die durch Kaliumquecksilberjodid entstehende gelbweiße Trübung durch Schwefelwasserstoffwasser besser sichtbar machen.

Physostigmin

In den Samen von Physostigma venenosum Balf. findet sich Physostigmin, 0,1 % (Jobst und Hesse 1864): begleitet von Geneserin u. a. Nebenalkaloiden. Physostigmin, F. 105—106°, löst sich schwer in kaltem Wasser, leicht in Weingeist, Äther, Chloroform. Das Alkaloid färbt sich durch Licht und Luft leicht rot. Nach Heckel (Compt. rend., 1890, S. 88) werden die Alkaloide beim Keimen der Samen verbraucht.

Der mikrochemische Nachweis hat mit dem großen Stärkegehalt zu rechnen. Barth (Lit. S. 439, 6) empfiehlt: Jodjodkalium (neben dem Jodamylum schwer erkennbarer brauner N.), Bromwasser (gelbbrauner N., besonders reichlich in den beiden äußersten stärkefreien Zellagen

der Kotyledonen), konzentrierte Salpetersäure (schwache Gelbfärbung), Joddämpfe (gelbbraune Färbung neben der nur schwach gefärbten Stärke). Ammoniummolybdatschwefelsäure ist nicht zu verwerten, da sie auch an alkaloidfreien Präparaten Blaufärbung erzeugt.

Wagenaar[1]) beschreibt mikrochemische Reaktionen mit Natriumsalizylat und Goldbromid. Mit ersterem entstehen (aus dem Sulfat) Rauten und Sechsecke mit positiver Doppelbrechung und schiefer Auslöschung; letzteres (aus Goldchlorid und Natriumbromid in statu nascendi) bewirkt in salzsaurer Lösung erst Bildung von Tröpfchen, dann von braunen Prismen.

Die bei der Mikrosublimation erzielten hellgelben Tropfen zeigen im polarisierten Lichte zuweilen kleine Kriställchen, die möglicherweise Physostigmin darstellen, denn die Sublimate geben Alkaloidreaktionen.

Die Alkaloide finden sich im Samen (Barth) nur in den Kotyledonen, nicht in der Samenschale. Auch in der stärkefreien Plumula und Radikula scheint Alkaloid zu fehlen. In der Keimpflanze (Jacquemin, Lit. S. 493, 2) sind in der Wurzel Spuren im Bast und in einigen Parenchymzellen, im Stengel Spuren im Bast und im Rindenparenchym; im Blatte sind sie im Schwammparenchym nahe dem Hauptnerven und in diesem selbst in einigen subepidermalen Zellen der Oberseite. Die grünen Kotyledonen sind alkaloidfrei.

Trigonellin

Trigonellin, Methylbetain der Nikotinsäure (Jahns) kommt in den Samen und in etiolierten Keimpflänzchen verschiedener Leguminosen vor (Trigonella foenum graecum, Avena sativa, Pisum sativum), findet sich aber auch in anderen Familien, Mirabilis jalapa (Trier), Daucus carota, Wurzeln, Stachys, Knollen (Schulze), besonders in Samen (Strophanthus-Arten, Thoms), Cannabis sativa (E. Schulze) Coffea arabica (Polstorff), Coffea liberica (Gorter) u. a. m.[2]) Koffearin (Paladino) ist wahrscheinlich Trigonellin. Es bildet farblose, in Äther, Chloroform und Benzol unlösliche Prismen, F. 218°, und findet in den Keimpflänzchen nach Schulze keine weitere Verwendung. Beim

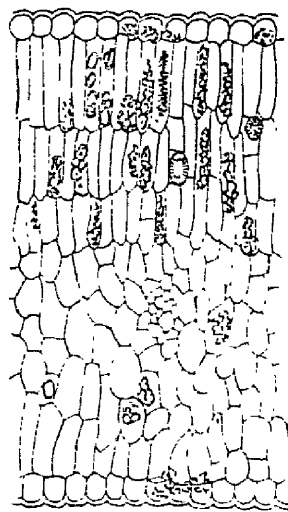



Fig. 116. Trigonella foenum graecum (Same, Querschnitt durch ein Keimblatt), Kristalle mit Platinchlorid-Salzsäure, Trigonellin (?) (Tunmann)

[1]) M. Wagenaar, Mikrochemische reacties op Physostigmine, Pharmac. Weekbl., 1929, LXVI, S. 381.

[2]) Auch im Tierreich (Seeigel) ist Trigonellin gefunden worden.

Samen von Trigonella foenum graecum wird die Mikrochemie von Tschirch und Oesterle (Anat. Atlas, S. 326) kurz berührt. „Auch das Trigonellin hat seinen Sitz in den Kotyledonen und der Radikula, denn beide werden durch Eisenchlorid rötlich und durch Kali gelb.“ Bei eigenen Versuchen, an dem gleichen Objekte ausgeführt, hatten Säuredämpfe, Pikrin-, Pikrolonsäure und Froehdes Reagens wenig Erfolg. Gold- und Platinchlorid geben amorphe Fällungen, die nach längerer Zeit kristallinisch wurden (Fig. 116). Sehr brauchbar war Quecksilberjodid-Jodkalium, besonders nach vorherigem Anfeuchten der Schnitte mit verdünnter Säure. Die Fällungen treten zumeist aus den Zellen heraus und wurden in allen Zellen des Keimlings erhalten. Die Reaktion mit Platinchlorid zeigt jedoch einen Maximalgehalt in den Palisaden an. — Schnitte geben die Reaktionen nicht.

Amorpha fruticosa L.

Mirande[1]) erhielt Fällungen mit Jodjodkalium und einigen anderen allgemeinen Alkaloidreagentien im inneren Rindenparenchym, einigen Zellen des Siebteils und dem äußeren Teil des Marks.

Thermopsis fabacea D. C. u. Thermopsis lanceolata R. Br.

Nachdem Guérin Alkaloid in Thermopsis fabacea gefunden hatte, studierte Jacquemin die Lokalisation in den beiden genannten Arten.

Stengel: Viel in Epidermis, Rindenparenchym und Siebteil.

Blatt: In Epidermis und Parenchym des Mittelnerven, auch im Blattparenchym.

Samen: In allen Teilen, auch in der Samenschale.

Acacia

Acacia Farnesiana Wall. nach Jacquemin: In der jungen Wurzel in einigen Zellen des Rindenparenchyms, in einigen Endodermis- und Siebteilzellen.

Im jungen Stengel: In Epidermis, Rindenparenchym und Siebteil.

Auch Acacia tenerrima Miqu. soll ein Alkaloid enthalten.

Sophora tomentosa L.

Wurzel: Reichlich im Rindenparenchym, Kambium, Siebteil und in den Markstrahlen.

Stengel: In Epidermis, Rindenparenchym, Siebteil, Markstrahlen und Mark.

---

[1]) Mirande, Recherches physiologiques et anatomiques sur les Cuscutacées, Thèse Doct. Paris III, 1900 nach Goris, Localisation, S. 114.

Blatt: In den Epidermen und dem Lückengewebe des Mittelnerven; weniger im Parenchym der Blattfläche.

Samen: Ein wenig Alkaloid in den äußeren und mittleren Lagen der Samenschale und im ganzen Keimling.

Baptisia australis R. Br.

Guérin und Jacquemin ermittelten die Lokalisation mit den allgemeinen Fällungsmitteln, auch mit Bromwasser.

Stengel: Epidermis, Rindenparenchym, Siebteil, Markstrahlen.

Blatt: Epidermen, Parenchym, besonders im Mittelnerven und im Siebteil des letzteren.

Frucht: Viel im Epikarp, weniger im Mesokarp, im Siebteil der Funikulusbündel; im Ovulum.

Crotolaria

In einigen Crotolaria-Arten wird Cytisin vermutet. Grogg[1]) hat die Samen von Crotolaria verrucosa L. untersucht und glaubt mit Hilfe allgemeiner Alkaloidreagentien festgestellt zu haben, daß Alkaloid in der obliterierten Schicht der Samenschale, zum großen Teil auch in den peripheren Zellen des Schleimendosperms lokalisiert ist. Auch der Embryo soll Alkaloid enthalten.

Erythrina

Jacquemin[2]) hat die Lokalisation der Alkaloide in Erythrina viarum Tod. und E. insignis Tod. studiert, in E. crista-galli L. ihre Abwesenheit festgestellt. Goris[3]) untersuchte E. corallodendron L.

Zum Nachweis dienten die allgemeinen Fällungsmittel (Jodjodkalium, Kaliumwismutjodid, Pikrinsäure u. dgl.).

Erythrina viarum u. insignis

Wurzel: In Endodermis, darunter gelegenen Schichten, Mark und ein wenig im Siebteil; in älteren Wurzeln weniger im Mark und mehr im Parenchym.

Stengel: In Epidermis, Rindenparenchym (besonders den subepidermalen Schichten und in der Nähe des Pericykels), Siebteil und Mark. In der Epidermis und der darunter gelegenen Schicht findet man Idioblasten mit reichem Alkaloidgehalt. Alkaloidreich ist der Vegetationspunkt.

---

[1]) O. Grogg l. c. S. 445, 2.

[2]) A. Jacquemin, Sur la localisation des alcaloides chez les Légumineuses, Rec. de l'Inst. Errera, Univ. Bruxelles, 1906, VI, S. 257.

[3]) Goris, Localisation usw., S. 113.

Blatt: Besonders in den großen Zellen der Epidermis und der darunter gelegenen Schicht, hauptsächlich in der Nähe der kleineren Nerven.

Samen: Samenschale alkaloidfrei: Der Keimling in allen Teilen alkaloidreich.

Erythrina corallodendron L.

Wurzel: In den dem Korkkambium angrenzenden Zellen des Phelloderms, im Rindenparenchym und den Markstrahlen, besonders auch in größeren idioblastischen Zellen.

Blattstiel: In den Wucherungen des Rindenparenchyms in chlorophyllfreien großen Zellen (Alkaloid-Reservoire), die sich unmittelbar oder ein- bis zwei Zellagen entfernt unter der Epidermis finden.

Blatt: In den Nerven dieselben Alkaloid-Reservoire, in der Blattfläche sind sie unter der Epidermis oder der subepidermalen Schicht. Alkaloid findet sich ferner in der unteren Epidermis, besonders unterhalb des Mittelnerven.

Stengel: In den dem Kork angrenzenden Schichten; ferner ein wenig in der Epidermis, den Rindenparenchym, den Markstrahlen und einigen Zellen des Marks.

Erythroxylaceae

Erythroxylon coca

Aus Erythroxylon-Arten sind verschiedene Basen isoliert worden; Cocain (Hauptalkaloid, Gaedcke 1855, Niemann 1860), Tropa-, Methyl-, Cinnamylcocain, Benzoylecgonin, Hygrin, Cuskhygrin, α- und β-Truxillin. Der Gehalt an Gesamtalkaloid schwankt in den Blättern von E. coca von 0,607—1,06 % (Hartwich, 1905); E. montanum führt 0,128 %, E. retusum 0,167 % (Eijkman, 1888). E. Ulei Schulze und E. subracemosum sind alkaloidfrei (Hartwich, 1909). Die Rinde führt bei E. coca 0,976, bei E. montanum 0,035, E. retusum 0,041 %. Die Stengel von E. coca enthalten 0,38 %, die Früchte 0,088—0,11 %. Eingehende Studien über die Java-Kulturen verdanken wir de Jong (Teysmannia, 1906, XVIII, S. 120). Der Prozentgehalt ist in jugendlichen Blättern am höchsten, die absolute Menge nimmt langsam zu. Nach Tunmann und Jenzer, welche die Basen als Abbauprodukte auffassen (Verdunkelung, Abtrennen von Blatthälften), hatten je 1000 Blätter von E. coca (Berner Gewächshauspflanzen) folgenden Gesamtgehalt: 3 cm lang = 0,120 g oder 1,454 %, 5 cm lang = 0,225 g oder 1,227 %, 6—8 cm lang = 0,386 g oder 0,808 %. Die Samenalkaloide werden beim Keimen ausgelaugt. In den Keimpflänzchen erfolgt Neubildung (Fig. 117). Die Individualität im Alkaloidgehalt läßt sich bereits an ½jährigen Topfpflanzen ermitteln (Tunmann, 1911).

Cocain. Monoklin-sphenoidische 4—6seitige Prismen und Tafeln. F. 98°. Schwer in Wasser löslich, leicht in Weingeist, Äther, Benzol und Chloroform. Zum mikrochemischen Nachweis dienen die allgemeinen Fällungsreaktionen und die Fällung mit Chromat. Von neueren Reagentien wäre noch zu erproben: [Tetranitrito-diammino-kobalti]-Kalium.

Zum Nachweis des Cocains im Gewebe — wenn auch nicht in der Zelle — verwandte Brandstetter[1]) folgende Reaktionen: 1. Grobe Schnitte werden zuerst mit einer Spur Salzsäure-Alkohol betupft; nach Abdunsten des Alkohols werden die Schnitte auf dem Objektträger mit einer 5proz. Lösung von Chromsäure behandelt, worauf eine Spur konzentrierte Salzsäure hinzugefügt und mit dem Deckglas bedeckt wird. Im Verlauf einer Stunde kristallisieren außerhalb des Gewebes feine Kristallnadeln von Cocainchromat aus, die sich nach einiger Zeit deformieren und lösen. 2. Klein zerschnittene Teile des Gewebes werden auf einem ausgehöhlten Objektträger nach Zusatz von 1—2 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure erwärmt, nachdem man einen Glasring aufgesetzt und darüber einen zweiten mit einem Tropfen Wasser gekühlten Objektträger angebracht hat. War Cocain vorhanden, so bildet sich auf diesem ein Beschlag von Benzoesäure.

Mit diesen Methoden fand Brandstetter, der im Warmhaus gezogene Pflanzen untersuchte, daß die Hauptmenge des Cocains im Mesophyll des Blattes enthalten ist; es findet sich auch im Blattstiel, dagegen nicht in der Blattepidermis. Im Stamm tritt es nur in der Rinde auf, nicht im Holz und im Periderm. In Wurzel, Blüten und Samen fand er kein Alkaloid.

Klein und Sonnleitner[2]) empfehlen als beste Methode die Mikrosublimation: Frische Blätter werden zerkleinert, am besten mit $Ca(OH)_2$ aufgeschlossen und im Sublimationsapparat bei einer optimalen Temperatur von 150—160° 1½—2 Stunden sublimiert. Es bilden sich dann feine weiße Beschläge, die mit $AuCl_3+KBr$ eine amorphe rotbraune, nach kurzer Zeit in X-förmige Kristalle übergehende Fällung geben.

Tunmann hatte schon vorher beobachtet, daß bei der Mikrosublimation des Pulvers oder der Schnitte außer Benzoesäure Alkaloid sublimiert.

Die Goldbromid-Reaktion tritt auch direkt mit den Schnitten ein. Klein und Sonnleitner ziehen außerdem noch die Sublimation der Benzoesäure und eine Extraktionsmethode heran.

Sie fanden so, daß die weitaus größte Menge des Alkaloids ihren Sitz im Blatt hat, daß außerdem sich am meisten Alkaloid in jungen Blütenknospen findet. Wenig Alkaloid führen Rinde + Kork, nur Spuren finden sich in Holz und Mark.

Über den mikrochemischen Alkaloidnachweis geben Tschirch und Oesterle[3]) an, daß man im Blattmesophyll durch Kalilauge in der

[1]) H. Brandstetter, Über den mikrochemischen Nachweis des Cocains in Erythroxylon Coca Lam. Pharmaz. Monatsh., 1922, III, S. 92.

[2]) G. Klein u. H. Sonnleitner, Der mikrochemische Nachweis des Kokains, Österr. bot. Zeitschr., 1927, LXXVI, S. 263.

[3]) A. Tschirch-Oesterle, Anatom. Atlas, 1900, S. 263.

Wärme „in einigen Zellen kleine nadelartige Kriställchen" erhält, „die wohl Cocain sein dürften, das sich mit Kaliumquecksilberjodid oder Jodlösung nicht eben viel besser mikrochemisch nachweisen läßt". Tunmann und Jenzer[1]) gebrauchten zum Nachweis: Jodjodkalium, Kaliumwismutjodid (kleine rotbraune Kristalle, auch Tröpfchen), Chlorzinkjod (große braune Tropfen), Brombromnatrium, Pikrinsäure (gelbe Niederschläge), Platinchlorid, Goldchlorid, Kaliumquecksilberjodid (gelbweiße, körnige Fällungen), Quecksilberchlorid, Überchlorsäure (weiße Körnchen), Kaliumpermanganat (1 : 100,0, violettrote Tropfen von gelapptem Umriß). Sämtliche Fällungen lösen sich bei längerem Liegen der Präparate im überschüssigen Reagens wieder auf. Fällungen kristallinischer Natur erhält man öfters, wenn man die Schnitte in einen kleinen Tropfen Platinchlorid (mit Salzsäure versetzt) einträgt, so daß die Schnitte gerade durchfeuchtet sind. Nach einigen Minuten werden sie in einen Tropfen Alkohol übertragen. Die Basen lassen sich aus den Präparaten lebender Pflanzen zum großen Teil mit Wasser ausziehen. Das Material muß in lebendem Zustande untersucht werden, die Präparate dürfen zuvor nicht längere Zeit im Wasser gelegen haben. Der Alkaloidgehalt ganzer Blätter, die in feuchter Kammer aufbewahrt waren, nahm über 50 % ab.

Fig. 117. Erythroxylon coca, Keimpflänzchen. In *a* und *b* mikrochemisch in Schnitten noch kein Alkaloid nachweisbar, erst in den Blättern von *c*. Bei *d* häufig auftretende Form der ersten Laubblätter (Tunmann)

Im Blatte sind nach Tunmann und Jenzer die Alkaloide in der Epidermis beider Seiten und in einigen Mesophyllzellen, im Hauptnerv und Blattstielchen in der Epidermis[2]), in subepidermalen Zellreihen, in den den Markstrahlen vorgelagerten Parenchymzellen und in zerstreuten Zellen des Markes und des Rindenparenchyms. Die alkaloidhaltigen Zellen bilden Zellzüge, die sich bei den Reaktionen scharf von dem völlig alkaloidfreien Nachbargewebe abheben. Die gleiche Lokalisation wie im Blattstiel sehen wir im Stengel und Blütenstiel. Kelch

[1]) O. Tunmann u. R. Jenzer, Pharm. Unters. über Pilocarpus und Erythroxylon Coca mit Berücksichtigung der Alkaloide, Verh. Naturf.-Vers. Salzburg, 1909 (1910), II, 1, S. 114 und Schweiz. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1910, XLVIII, S. 17.

[2]) Über den gegenteiligen Befund von Brandstetter s. oben.

und Blumenblätter haben die Alkaloide in der Epidermis und im Nervenparenchym, während im Embryo und Endosperm geringe Spuren nachweisbar sind (doch nicht bei allen Früchten, da offenbar die Menge wechselt und an sich sehr gering ist).

Hygrin

Begleitet in manchen Cocablättern das Cocain.

Farblose sich an der Luft bräunende Flüssigkeit Kp. 193—195°.

Die besten Reagentien für Hygrin sind nach Klein und Soos[1]) Chloranil, Kaliumwismutjodid, Reineckesalz und Dinitro-α-Naphthol. Am empfindlichsten ist das letztere und wurde deshalb von den genannten zum Nachweis des Hygrins in Coca verwendet. Eine wässerige Hygrinlösung gibt mit festem Dinitro-α-Naphthol tief orangegelbe, sechseckige rechteckige oder rhombische Prismen (F. 137°) meist mit einspringenden Ecken, im Trocknen oft zu Rosetten oder andern Gruppen vereinigt (Fig. 118). Mit der weingeistigen Lösung des Reagens bilden sich außer diesen Kristallen besonders am Rand und außerhalb des Deckglases kleine und größere palmwedelförmige Kristalle. Erfassungsgrenze 5 γ.

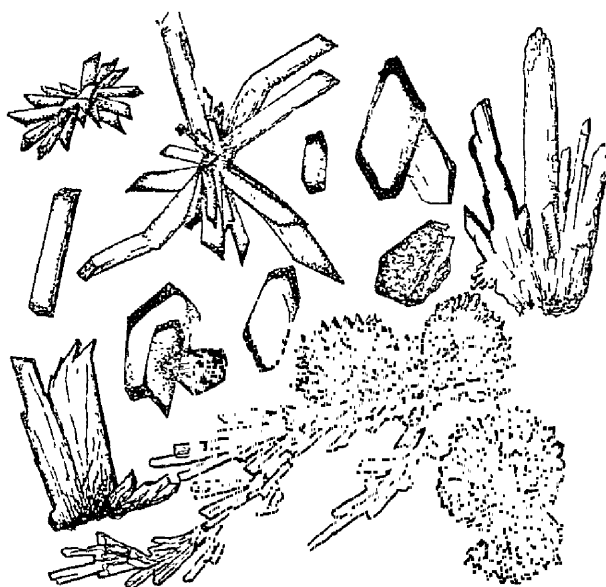



Fig. 118.
Hygrin-Dinitro-α-naphtholat
(Klein u. Soos)

Das Hygrin kann so direkt im Gewebe, im Destillat und im Extrakt nachgewiesen werden. Zum Nachweis im Gewebe bringt man Blattschnitte mit Dinitro-α-Naphthol (entweder in gesättigter weingeistiger Lösung oder mit festem Reagens und Weingeist) in die feuchte Kammer.

Die beste und sicherste Methode ist nach Klein und Soos der Nachweis im Destillat. Gut zerriebene Pflanzenteile werden mit wenig Wasser und einigen Tropfen einer konzentrierten Lösung von Kalziumhydroxyd im Mikrodestillationsapparat[2]) über dem Ölbad destilliert. In einem Tropfen des Destillats wird das Hygrin mit Dinitro-α-Naphthol nachgewiesen.

[1]) G. Klein u. G. Soos, Österr. bot. Zeitschr. 1929, LXXVIII, S. 157.

[2]) G. Klein, Methoden der Mikrochemie in „Methoden der Biologie" (Berlin, Springer, 1928), S. 1028.

Blatt und Rinde enthalten ziemlich viel Hygrin, Mark und Holz wenig, die Blüte nichts.

Rutaceae

Esenbeckia febrifuga

In der Rinde von Esenbeckia febrifuga A. Juss. (Evodia f. St. Hil.) hatten Oberlin und Schlagdenhauffen[1]) ein Alkaloid ermittelt (Evodin). Hartwich und Gamper[2]) fanden 5 Alkaloide, das Hauptalkaloid ist das Esenbeckin. Es gibt so scharfe Reaktionen, daß es zur Diagnose des Pulvers der Rinde dienen kann, und wird nachgewiesen mit konzentrierter Salpetersäure, die mit dem gleichen Teile Wasser verdünnt ist. Die alkaloidhaltigen Zellen werden grün, nach einiger Zeit rot bis rotbraun. Läßt man ferner auf die Präparate kurze Zeit wässerige Kaliumdichromatlösung einwirken, so erkennt man bei Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure bei gleichzeitiger Beobachtung die Alkaloidzellen an einer intensiven blaugrünen Färbung. Auch Jodsäure sowie Goldchlorid färben blaugrün. Die Alkaloide finden sich nur im Phelloderm und zwar bei innerer Peridermbildung ausschließlich im jüngsten Phelloderm. Die Alkaloide im älteren Phelloderm müssen sich inzwischen zersetzt haben, oder aber sie sind ausgewandert oder verbraucht.

Pilocarpus

In den Blättern von Pilocarpus pennatifolius u. a. P.-Arten finden sich Pilocarpin und Pilocarpidin, in denen von Pilocarpus microphyllus das Pilosin (Carpilin).

Pilocarpin. Nadeln F. 34°. Löslich in Wasser und Weingeist, Äther und Chloroform, unlöslich in Benzol.

Die Menge der in allen Teilen der Pflanze auftretenden Alkaloide schwankt bei den einzelnen Arten bedeutend. P. macrophyllus 0,84, P. spicatus 0,16, P. trachylobus 0,40, P. jaborandi 0,72 (Paul und Cownley, 1896), P. pennatifolius 0,40—0,50, P. microphyllus 1,48 % (Jenzer, 1910). Diese Werte beziehen sich auf Drogenmaterial (Blätter), bei dem eine Abnahme durch mangelhafte Aufbewahrung nicht ausgeschlossen ist. Bei einem freiwachsenden Pilocarpusstrauch (P. pennatifolius) in La Mortola wurden ermittelt: Blütenstielchen 0,51, Blütenknospen 0,44, Blütenachsen 0,27, Fiederblätter 0,24, Blattspindeln 0,23, jüngere Stengel (2jährig) 0,18 % (Tunmann und Jenzer, Lit. S. 496, 1). Während die Blätter dieses Strauches 1909 nur 0,224 %, 1910 0,223 % Gesamtalkaloid enthielten, ließen sich bei den Tochterpflanzen, die in Bern im Gewächshause gezogen

---

[1]) Oberlin u. Schlagdenhauffen, Et. histor. et chim. de different. écorces. d. la famille des Diosmées, Nancy 1878.

[2]) C. Hartwich u. M. Gamper, Arch. d. Pharm., 1900, CCXXXVIII und: Gamper, Beitr. z. K. der Angosturarinden, Dissertat., Zürich 1900.

waren, in den Blättern 3- bis 4mal so große Mengen nachweisen. Hierbei zeigten sich bei den einzelnen Individuen größere Differenzen, trotzdem sie unter gleichen Verhältnissen (Boden, Belichtung) in Kultur standen. Strauch I (Blatt = 1,03, Strauch II = 0,70 %. Die Alkaloide wurden als Abbauprodukte angesprochen. Im Blatte erfolgt bei weiterem Wachstum eine Abnahme im Prozentgehalt, bei Berücksichtigung der absoluten Mengen läßt sich aber eine Vermehrung feststellen. 50 Blätter, 6 cm lang = 0,0305 g oder 0,235 %, 12—16 cm lang = 0,0621 g oder 0,200 % Alkaloid.

Zum mikrochemischen Nachweis zog Boelling[1]) Jodjodkalium, Kaliumwismutjodid, Chlorzinkjod, Pikrinsäure heran. Nach Tunmann[2]) leisten gute Dienste Chlorzinkjod, Kaliumquecksilberjodid, Jodjodkalium und Kaliumwismutjodid (kleinkörnige Fällungen). Diese Reihenfolge entspricht der zunehmenden Empfindlichkeit der Reagentien. Zur Untersuchung ist lebendes Material zu verwenden, das vorher nicht gewässert worden ist. Die Niederschläge lösen sich in dem überschüssigen Reagens bald wieder auf; sie entstehen in den Vakuolen. Die Chromatophoren sind, entgegen der Ansicht von Elfstrand[3]), alkaloidfrei.

Fig. 119. Pilocarpus pennatifolius, obere Epidermis; *a*) lebende Zelle, *b*) bei Beginn der Einwirkung von Jodjodkalium, bei *c*) ist die Fällung vollendet, bei *d*) ist die Alkaloidfällung durch Auswaschen entfernt (Tunmann)

Die Lokalisation der Alkaloide im Blatte ist folgende: In fast allen Zellen der oberen Epidermis (Fig. 119), auch in den Deckzellen der Drüsen, in vielen Zellen der unteren Epidermis, in vereinzelten Mesophyllzellen, vorwiegend in solchen, die der unteren Epidermis anliegen. In den Nerven führen außer der Epidermis die subepidermalen Zellreihen, sowie einzelne Parenchymzellen Alkaloide, vornehmlich die den Markstrahlen der Bündel vorgelagerten Zellen und einzelne Zellen des Markes. Die Alkaloidzellen der Nerven bilden Zellzüge (Längsschnitte). Elfstrand und Boelling hielten die Epidermis für alkaloidfrei, ersterer hatte nur getrocknetes Material untersucht, letzterer wahrscheinlich

[1]) G. Boelling, Beitrag zur Kenntnis einiger alkaloidhaltiger Pflanzen mit Berücksichtigung ihrer Anatomie und des mikrochem. Nachweises ihrer Alkaloide, Dissertation, Erlangen 1900, S. 15.

[2]) O. Tunmann, Über den mikrochem. Alkaloidnachweis, speziell in den Blättern von Pilocarpus pennatifolius Lem., Schweiz. Wochenschrift f. Ch. u. Ph., 1909, XLVII, S. 177.

[3]) M. Elfstrand, Untersuchungen über brasilianische Drogen, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1897, VII, S. 290.

keine Flächenschnitte, doch konnten Tunmann und Jenzer ihre mikrochemischen Befunde quantitativ begründen. Die obere Epidermis des freiwachsenden Strauches in La Mortola führte 0,51 %, die der Berner Gewächshauspflanzen 0,98 % Alkaloid. Die Lokalisation in Blattspindeln, Stengeln, Blütenstielen ist die gleiche wie im Blattnerven (Zellzüge in Mark und Parenchym, sowie Epidermis). Bei alkaloidarmen Pflanzen kann in der Stengelepidermis Abnahme der Alkaloide bis zum gänzlichen Schwinden stattfinden. Durch hohen Alkaloidgehalt sind Samenanlagen und Fruchtblätter ausgezeichnet. Die Pollenkörner sind in unreifem Zustande alkaloidhaltig, während die schizogenen Sekretbehälter, Oxalatzellen, mechanischen Elemente und Siebteile alkaloidfrei sind. In den dunkelvioletten Blumenblättern ist der Nachweis nicht zu erbringen.

Alkaloid von Ruta graveolens L.

Über dieses makrochemisch nicht näher bekannte Alkaloid macht Wester[1]) die Angabe, daß es im Blatt in den Epidermiszellen lokalisiert ist (Nachweis mit Jodjodkalium und Joddämpfen). Hauptnerv, Blattstiel und die holzartigen Zweige gaben keine Alkaloidreaktionen.

Flindersin

Findet sich in Flindersia australis, dessen Gefäße mit dem weißen kristallinischen Alkaloid dicht angefüllt sind.

Nadelförmige Kristalle, die nach Zersetzung bei ca. 170° bei 182—183° schmelzen. In Weingeist leicht, in Äther sehr schwer löslich. Von den mit Alkaloidfällungsmitteln entstehenden Niederschlägen schmilzt das Pikrat nach Umkristallisieren aus Weingeist bei 174°, das Chloroplatinat nach der gleichen Behandlung bei 262°. Mit konz. Schwefelsäure gelbgrün[2]).

Aquifoliaceae, Sapindaceae, Sterculiaceae und Theaceae

Coffein und Theobromin

Coffein (Thein, Caffein, Methyltheobromin, Trimethylxanthin), 1820 von Runge entdeckt, 1897 von E. Fischer aus Harnsäure synthetisch hergestellt, bildet seidenglänzende Nadeln, die bei 234° schmelzen und sublimierbar sind; sie lösen sich unter Deckglas in heißem Wasser, Alkohol, Chloroform und Benzol. Theobromin (Dimethylxanthin), 1841 von Woskressensky entdeckt, ist im allgemeinen schwerer löslich als Coffein und bildet Nadeln, die ebenfalls ohne Zersetzung sublimieren. Theophyllin ist dem Theobromin isomer und kristallisiert in Tafeln. Während Theophyllin nur in Thea sinensis (Theaceae) vorkommt, tritt

---

[1]) D. H. Wester, Lokalisation einiger Alkaloide, Ber. deutsch. pharmaz. Ges., 1914, XXIV, S. 125.

[2]) H. Matthes u. E. Schreiber, Über hautreizende Hölzer, Ber. deutsch. pharmaz. Ges., 1914, XXIV, S. 385 und zwar S. 430.

Coffein in Thea, der Rubiacee Coffea, den Sterculiaceen Theobroma cacao und Cola, den Sapindaceen Paullinia cupana und P. Scarlatina und der Aquifoliaceen-Gattung Ilex auf (Ilex paraguinensis, Casseni, vomitoria). Theobromin findet sich in Cola, Theobroma und Thea.

Aus dem reichhaltigen Analysenmaterial der Literatur können hier nur einige Zahlen mitgeteilt werden, die jedoch zur Vorstellung über die Verteilung der Basen in den einzelnen Organen der Pflanzen genügen. — Coffein (in Prozenten): Coffea liberica: junge Blätter 0,5—0,9, alte Blätter, Rinde, Holz, Wurzel koffeinfrei, junge Stengel 1,1, Perikarp und Integumente Spuren, unreife Samen 1,2. Coffea arabica: Früchte 1—1,3, Holz, Wurzel, Rinde koffeinfrei oder doch nur Spuren, junge Blätter 1,42, alte Blätter 1,26, junge Stengel 0,6. alte grüne Stengel 0,2. Durch das Rösten der Kaffeebohnen wird der Coffeingehalt nicht vermindert, Rohkaffee 1,05—2,83, nach dem Rösten 1,09—2,95. Thea sinensis: Blütenteile 0,6—1,5, selbst 2,10, grüne Perikarpien 0,6, Samen Spuren — 0,1, jüngste Knospenblätter 3,4, ältere 1,5, junge Blätter 2—2,50, alte Blätter 1,5—1,8, Trichome junger Blätter 2,2, Wurzeln und Holz alkaloidfrei oder nur Spuren. Ilex paraguinensis: die Werte der einzelnen Handelssorten schwanken bedeutend, Paraguay ohne Stengel 1,37, mit Stengel 1,50, Brasilien 0,72. Paullinia cupana: Samen 4—6; Cola acuminata: Nüsse (Keimblätter) 1,3—3,7 %, junge Blätter 0,05; Theobroma cacao: Samen 0,2—0,3. — Theobromin: Theobroma cacao: Früchte 1—2,3, Samenkerne 1,5—1,9, Samenschalen 0,3—1,38. Cola: junge Blätter 0,1, alte Blätter alkaloidfrei, Nüsse 0,023—0,053.

Über die Art der Bindung der Xanthinbasen im Pflanzenkörper sind die Meinungen geteilt, jedenfalls ist diese bei den einzelnen Pflanzen verschieden. In der getrockneten Kaffeebohne soll Coffein an Chlorogensäure gebunden sein Gorter), in frischen Colanüssen kommt es in Form einer labilen Gerbstoffverbindung vor. Rosenthaler und Mosimann fanden die Purinbasen immer in Begleitung von Tanniden. Über die physiologischen Aufgaben der Basen herrschen ebenfalls Widersprüche. O. Kellner u. a. betrachten sie als plastische Baustoffe, Heckel hält sie im Samen von Theobroma, Gaucher im Coffeasamen als Reservestoffe und nach Weevers[1]) werden sie bei Tee, Kaffee, Kakao und Cola zur Eiweißsynthese verbraucht. Auch bei Paullinia cupana und Ilex paraguinensis wird das Coffein nach Weevers[2]) wieder in den Stoffwechsel einbezogen. Anderseits werden die Basen von Clautriau, Suzuki, Hartwich und Du Pasquier als Abbauprodukte angesprochen und in Parallele mit den Xanthinen tierischer Sekrete gebracht.

In den grünen Beeren von Coffea arabica L. fand Camargo außer Coffein, Adenin und Hypoxanthin reichlich Vernin. Dieselben Bestandteile kommen auch

[1]) Th. Weevers, Bemerkungen über die physiologische Bedeutung des Coffeins, Ann. d. Jard. Bot. de Buitenzorg, 1910, 2, IX, S. 18.

[2]) Th. Weevers Concerning the function of Coffein in the metabolism of Paullinia cupana, Proceedings Kon. Akad. van Wetenschapen te Amsterdam, 1926, XXIX, S. 1048; Derselbe, die Funktion des Coffeins im Stoffwechsel von Ilex paraguariensis, ebenda, 1929, XXXII, S. 281; Chem. Centralbl., 1929, II, S. 2786.

in normalen grünen Blättern vor, während erfrorene mehr Coffein und das in frischen Pflanzenteilen fehlende Guanin enthalten. Camargo[1]) schließt daraus, daß Coffein aus Vernin über Guanin und Xanthin entsteht.

Über Grenzkonzentration und Erfassungsgrenze einiger Coffein- und Theobromin-Reaktionen macht Wagenaar folgende Angaben:

1. Coffein[2]).

	Grenz-konzentration	Erfassungs-grenze γ
Aussalzen mit $(NH_4)_2SO_4$	1 : 2000	5
Aussalzen mit $(NH_4)_2HPO_4$	1 : 5000	2
Merkurichlorid	1 : 1000	2
Goldchlorid	1 : 1000	2
Jodjodkalium	1 : 1000	2
Jodjodcäsium	1 : 1000	2
Brom	1 : 250	10
Kaliumwismutjodid, dann Salzsäure	1 : 1000	5
Kaliumantimonjodid	1 : 1000	5

2. Theobromin[3]).

	Grenz-konzentration	Erfassungs-grenze
Me kurichlorid	1 : 1000	5
Goldchlorid	1 : 100	10
Silbernitrat	1 : 100	10
Jodjodkalium	1 : 1000	2
Brombromkalium	1 : 1000	1
Kaliumwismutjodid, dann Salzsäure	1 : 1000	2
Kaliumantimonjodid[4])	1 : 1000	1

Über das im Thee vorkommende Theopyllin liegen keine pflanzenmikrochemischen Angaben vor. Mikrochemische Reaktionen s. M. Wagenaar, Bijdrage tot de microchemie van Theophylline, Pharmac. Weekbl., 1928, LXVI, S. 131; Ref. in Mikrochemie, 1929, VII, S. 373.

Außerhalb der Zellen lassen sich Theobromin und Coffein bequem selbst mit kleinsten Schnitten nachweisen.

---

[1]) T. A. Camargo, Journ. biol. chemist., 1924, LVIII, S. 831; Jahresber. Pharmazie, 1924, S. 34.

[2]) M. Wagenaar, Mikrochemische reacties op coffeine, Pharmac. Weekbl., 1928, LXV, S. 1334.

[3]) Wagenaar, Mikrochemische reacties op theobromine, Pharmac. Weekbl. 1929, LXVI, S. 1.

[4]) In der gelinde erwärmten salzsauren oder schwefelsauren Lösung entstehen gelbe Stäbchen und Sterne 400 μ lang, gerade auslöschend, negativ doppelbrechend.

Bei der einen der von Molisch[1]) angegebenen Methoden wird das Alkaloid rein, bei der anderen als Goldverbindung abgeschieden. Man erwärmt einige Schnitte auf dem Objektträger in destilliertem Wasser, läßt bei Zimmertemperatur eintrocknen und fügt alsdann einige Tropfen Benzol zu. Beim Verdunsten scheiden sich die Alkaloide in farblosen Nadeln aus. Auffallendere Resultate liefert die andere Reaktion. Man trägt einige Schnitte direkt in einen Tropfen konzentrierter Salzsäure ein, setzt nach 1—2 Minuten am Deckglasrande 3proz. Goldchloridlösung zu. Beim Eintrocknen scheiden sich vom Rande des Lösungstropfens her sehr lange gelbe spitze Nadeln aus, die zu strauch- und baumartigen Gebilden vereinigt sind (Fig. 120d). Es ist vorteilhafter, eine mit Säure versetzte Goldchloridlösung zu benutzen. Bei Anwendung einer stärkeren Goldchloridlösung (als 3 %) verursacht Salzsäure allein bereits Kristallbildung[2]). Verwechslungen zwischen den Kristallen der Reagenzlösung und dem Goldsalz der Basen sind nicht ausgeschlossen. Die Doppelsalze entstehen in den Sublimaten (s. unten) sofort, man kann ihr Wachstum mikroskopisch verfolgen; sie sind von gelber Farbe und fast stets an den Enden zugespitzt. Die Reagenzausscheidungen, die Salzsäure allein bewirkt, erscheinen im allgemeinen nach längerer Zeit, ihre Bildung hängt zum Teil von der Menge und Stärke der Salzsäure ab. Es erscheinen der Reihe nach farblose Würfel, schmale, farblose Stäbchen und Platten, sowie starke, gelbe Prismen (Fig. 120e).

Bequem wird der Nachweis durch Sublimation erbracht. Die Sublimierbarkeit der Purinbasen ist schon lange bekannt. Bereits Stenhouse und Heynsius[3]) wußten, daß man Coffein aus Drogen durch Sublimation erhalten kann. Waddington[4]) berichtet ebenfalls hierüber. Behrens[5]) benutzte die Sublimation zwischen Objektträgern, glaubte aber die Alkaloide zuerst isolieren zu müssen. Das gepulverte Material wurde mit etwas gebranntem Kalk unter Zusatz von Wasser auf dem Objektträger gemengt. Dann ließ man die Masse eintrocknen, zog sie mit Alkohol aus und sublimierte den Rückstand des Auszuges.

[1]) H. Molisch, Grundriß einer Histochemie der pflanzlichen Genußmittel, Jena 1891, S. 15.

[2]) T. F. Hanausek, Zur histochemischen Koffeinreaktion, Zeitschr. d. allg. österr. Apoth.-Ver., 1891, XXXV, S. 606; ferner: L. Cador, Untersuchung der Maté-Blätter unter Berücksichtigung ihres Gehaltes an Thein, Bot. Centralbl., LXXXIV, S. 251.

[3]) H. Heynsius, Journ. prakt. Chem., 1850, XLIX, S. 317.

[4]) H. J. Waddington, On microsublimation, Pharm. Journ. and Transact., 1867, 2, IX, S. 409.

[5]) H. Behrens, Mikroch. Analys., 1899.

Derart arbeiteten Th. und C. J. Weevers[1]) bei ihren physiologischen Untersuchungen. Doch erst durch die direkte Sublimation der pflanzlichen Objekte kam die Methode allgemein in Aufnahme. Nestler[2]) führte sie in mehreren Arbeiten an sämtlichen purinhaltigen Pflanzen aus und benutzte zur Sublimation die in Fig. 8, S. 31 angegebene Anordnung. Gleichzeitig wurde auch von anderer Seite die direkte Sublimation aufgenommen[3]). Es gelang aber mit der Sublimation nicht Theobromin von Coffein zu trennen und bei nicht entfetteten Samen (Cacao, Thea) wurden keine Kristalle erzielt, sondern erst mit den Auszügen (Nestler, DuPasquier). Beides läßt sich mit der Sublimation auf der Asbestplatte erreichen (S. 32), die ein rasches, starkes Erhitzen ermöglicht, so daß die mitsublimierenden Fettsäuren die Kristallisation

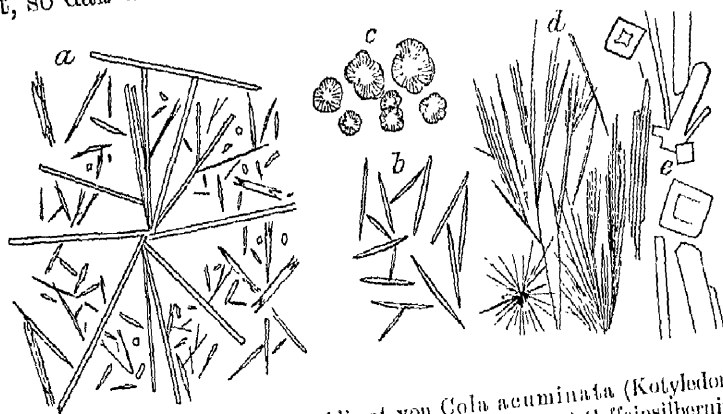



Fig. 120. Nachweis der Purinbasen. a) Sublimat von Cola acuminata (Kotyledonen), Coffeinkristalle. Theobroma cacao b) Theobrominkristalle im Sublimat, c) Coffeinsilbernitrat, d) Golddoppelsalz des Coffeins, e) Kristallausscheidungen im Goldchlorid auf Zusatz von Salzsäure (Tunmann)

der Purinbasen nicht hindern, wir erhalten dann (Fig. 120a, b) „anfangs feine, lange Nadeln (Coffein), später derbe, kurze Kristalle (Theobromin)" (Tunmann, Nat.-Vers., Karlsruhe 1911). Auch sechsseitige Kristalle

1) Th. Weevers und C. J. Weevers de Graaff, Onderzoekingen over eenige xanthine-derivaten in verband met de stofwisseling der plant, Ak. d. Wetenschapp., Amsterdam, 1903, XII, S. 369.

2) A. Nestler, Ein einfaches Verfahren des Nachweises von Thein und seine praktische Anwendung, Zeitschr. f. Nahr.- u. Genußm., 1901, IV, S. 289. — Über den direkten Nachweis des Cumarins und Theins durch Sublimation, Ber. deutsch. bot. Ges., 1901, XIX, S. 350. — Nachweis von extrahiertem Tee durch Sublimation, Zeitschr. f. Nahr.- u. Genußm., 1902, V, S. 245.

3) P. Kley, Mikroch. Unters. des Tees und einige Beobachtungen über das Coffein, Rec. trav. chim. Pays-Bas., 1901, V, S. 344. — Ph. Vadam, Bull. d. scienc. pharmacolog., 1900, II, S. 98. — G. L. Spencer, Rev. inten. fals., X, S. 15. — L. Frank, Praktische Anwendungen der Mikrosublimation, Zeitschr. Nahr.- u. Genußm., 1903, VI, S. 880.

treten auf (Eder). Theobromin, das erst bei höherer Temperatur übergeht, sich demnach in den zuletzt abgehobenen Sublimaten findet, ist kristallographisch bereits daran zu erkennen, daß es niemals lange Nadeln bildet. Die mittleren Sublimate enthalten natürlich Gemische beider Basen. Während die ersten Sublimate in Tetrachlorkohlenstoff löslich sind (Coffein), sind die letzten Beschläge darin unlöslich (Theobromin). Die Coffeinkristalle verschwinden bei Zusatz von wenig Chloroform sofort, während Theobromin schwer löslich ist. Diese Lösungsunterschiede genügen zur Diagnose. Die Goldsalze sind kaum zu unterscheiden. Zur Charakteristik der allerersten Sublimate, die unter Umständen einmal pulverig ausfallen können, und zur Differentialdiagnose dient Silbernitrat Fig. 120c). Ein Zusatz von verdünnter

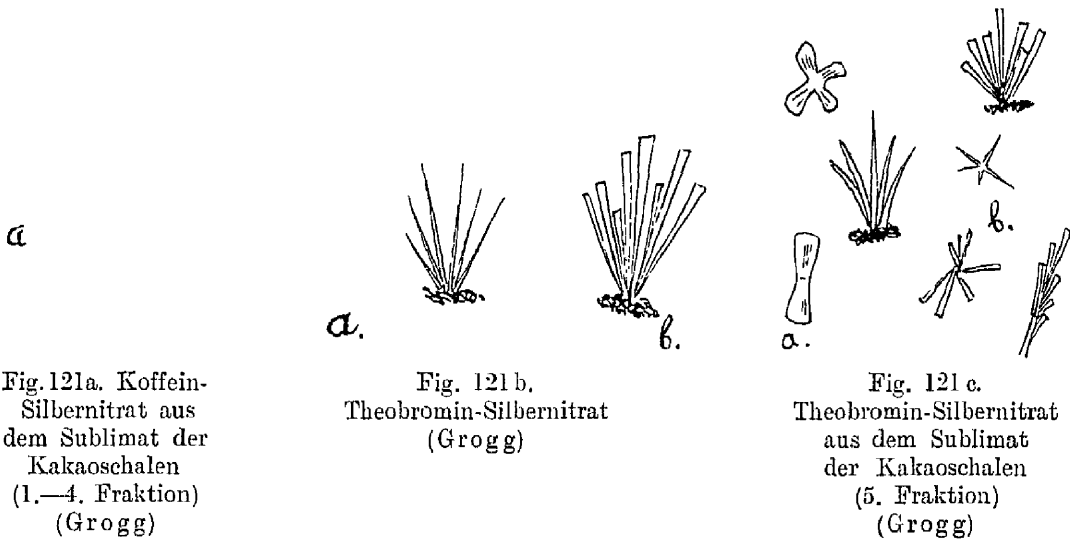



Fig. 121a. Koffein-Silbernitrat aus dem Sublimat der Kakaoschalen (1.—4. Fraktion) (Grogg)

Fig. 121 b. Theobromin-Silbernitrat (Grogg)

Fig. 121 c. Theobromin-Silbernitrat aus dem Sublimat der Kakaoschalen (5. Fraktion) (Grogg)

Salpetersäure, den Behrens vorschreibt, und der recht vorsichtig in einer Spur bemessen sein muß, ist nicht unbedingt erforderlich. Man durchstreicht das Sublimat mit wenig Silbernitrat; in kurzer Zeit schießen an den Strichgrenzen zierliche sphärokristallinische Gebilde an (Coffein) oder kurze Nadeln in Büschel oder einzeln liegend (Theobromin).

Grogg[1]) erhielt, als er die durch fraktionierte Sublimation der Kakaoschalen gewonnenen Sublimate mit Silbernitrat behandelte, in den ersten vier Fraktionen die vom Coffein herrührenden zierlichen sphärischen Gebilde, sowie moosähnliche Kristallaggregate (Fig. 121a). In der fünften Fraktion entstanden daneben in der Mitte eingeschnürte hantelförmige Kristalle, die dann — vom Theobromin herrührend — in den späteren Fraktionen immer mehr dominieren. Die zuerst erwähnten Gebilde waren aber bis zuletzt zu sehen.

[1]) O. Grogg, Über das Vorkommen von Alkaloiden in der Nährschicht der Samenschalen, Diss. Bern, 1921.

Für den Nachweis von Theobromin in den Kakao-Sublimaten ist es von Vorteil, aus ihnen das Fett durch kurzes Abwaschen mit Petroläther zu entfernen.

An weiteren Reaktionen zur Unterscheidung von Coffein und Theobromin gibt Tunmann[1]) noch folgende an:

Hält man pulverige Sublimate ½—¾ Minute über die Öffnung eines Glases mit konzentrierter Salzsäure, so kristallisiert Coffein innerhalb einiger Minuten in schönsten Kristallen, während pulverige Theobrominbeschläge sich nicht verändern, sondern pulverig bleiben. Wässerige Weinsäurelösung (1 : 10) löst Coffein sofort, während Theo-

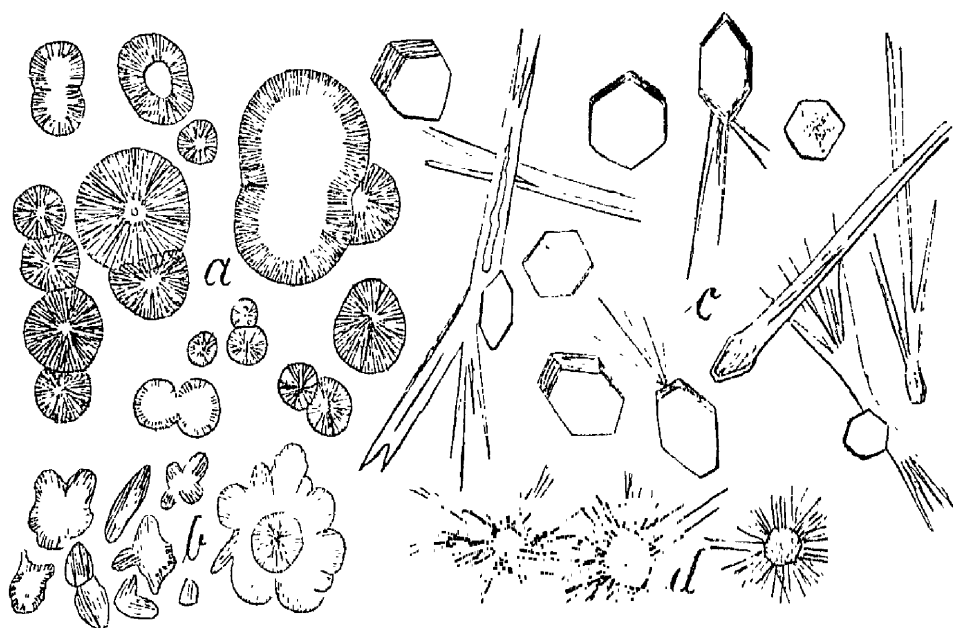



Fig. 122. Chloralhydratreaktion, a) u. b) mit Theobromin, c) u. d) mit Koffein

bromin am Rande des Tropfens als ein bei mikroskopischer Betrachtung bräunlich erscheinendes Pulver abgesetzt wird. Konzentrierte wässerige Chloralhydratlösung löst Coffein sofort in der Kälte, Theobromin erst beim Erhitzen. Nach dem Eintrocknen scheidet sich Theobromin in schönen Sphärokristallen aus, Coffein in ähnlichen Kristallen wie bei der Behandlung mit Salzsäuredämpfen (Fig. 122). Auch gegen Brombromkalium ergeben sich Unterschiede: Coffein gibt gelbliche Prismen, die meist zu größeren Aggregaten (Büschel, Drusen) vereinigt sind (Eder), Theobromin dünne, gelbrote lange Nadeln, teils einzeln, teils in Rosetten und Büscheln (Heiduschka und Meisner). Doch sind die Unterschiede nicht immer so ausgesprochen. A. Niet-

---

[1]) O. Tunmann, Kleinere Beiträge zur Pflanzenmikrochemie, Pharmaz. Zentralh., 1913, LIV, S. 1065.

hammer[1]) erhielt aus Coffein mit Reineckes Salz (s. S. 433) nach 10—15 Minuten rosa Kristallbündel, Rosetten und Drusen; mit Theobromin treten rascher kurze zartere Nadeln auf.

Zum Nachweis des Coffeins in Schnitten und Pulvern kann man auch die Extrahierungsmethode benutzen.

Tunmann[2]) läßt Schnitte oder Pulver mit etwas Ammoniak befeuchten, dann nach Auflegung des Deckglases Chloroform zusetzen und durch einseitiges Heben mischen. Einfacher ist die Anwendung ammoniakalischen Chloroforms. Man erhält am Rande Kristalle des Coffeins, die alle dessen mikrochemische Reaktionen geben (Rosenthaler[3])).

Mit seinem Verfahren konnte Tunmann die Purinbasen auch aus der Fruchtschale und dem Fruchtmus von Theobroma Cacao gewinnen.

Zum Nachweis der Lokalisation wird man von einer Reaktion mit Silbernitrat am besten ganz absehen. Silbernitrat ist bei gerbstoffhaltigem Material viel zu empfindlich. Zersetzungen können nicht nur durch noch nicht bekannte Substanzen der Schnitte, sondern auch durch das Präparieren (Licht, Metall) hervorgerufen werden. Auch Quecksilbersalze, die der Literatur[2]) nach mikrochemisch schon brauchbare Resultate geliefert haben, sind nicht zu empfehlen. Die Doppelverbindung mit Quecksilberchlorid, die bei Anwendung einer reinen Coffeinlösung aus langen Nadeln besteht, fällt bei Benutzung von Schnitten ganz unklar aus. Nur selten erhält man kleine Körnchen oder Täfelchen, oft nur braune Massen, niemals lange Nadeln. Unsicher ist ferner der Erfolg mit Jodjodkalium bei Gegenwart von verdünnter Schwefelsäure, wie auch Hartwich und DuPasquier[4]) bei den Teeblättern fanden. Das Eintreten der Reaktion (violetter Niederschlag) scheint wesentlich von dem richtigen Zusatz der Schwefelsäure abzuhängen. Bei stärkehaltigen Objekten ist die Reaktion ohnehin wenig geeignet. Die Murexidreaktion gelingt ebenfalls nicht, nach Clautriau[5]) selbst dann nicht, wenn man dünne Schnitte mit Coffein-

[1]) A. Niethammer, Beiträge zum mikro- und histochemischen Alkaloidnachweis, Biochem. Zeitschr., 1929, CCXIII, S. 138.

[2]) O. Tunmann, Zum Nachweis der Purinbasen in der Droge, Pharmazeut. Post, 1918, 1918, LI, S. 305.

[3]) L. Rosenthaler, Chemische Charakterisierung von Drogen, Schweiz. Apothek.-Ztg., 1924, LXII, S. 121.

[4]) P. A. Du Pasquier, Beiträge z. Kenntnis des Tees, Dissertation Zürich, 1908, C. Hartwich u. A. Du Pasquier, Apoth.-Ztg., 1908, XXIII, Sep.

[5]) G. Clautriau, Nature et signification des alcaloides végétaux, Rec. de l'Inst. bot. de Bruxelles, 1902, V, S. 35.

kristallen versetzt. Die von Schaer[1]) für makrochemische Zwecke angegebene Methode ist für uns wenig brauchbar. Hierbei werden die Präparate mit Perhydrol-Salzsäure (Perhydrol 1 Vol., Salzsäure 9 Vol.) erhitzt, die Flüssigkeit wird verdampft, der blaßrote Rückstand gibt mit Ammoniak eine purpurrote Färbung. Doch ist die Anwendung sehr starker Präparate nötig und selbst diese werden stets weitgehend zerstört.

Rosenthaler und Mosimann[2]) verwandten zum Nachweis der Lokalisation des Coffeins stark saure Reagentien, so Brombromkalium + Salzsäure, und Silikowolframsäure mit Salzsäure. Mit letzterem Reagens entsteht zunächst ein amorpher Niederschlag, aus

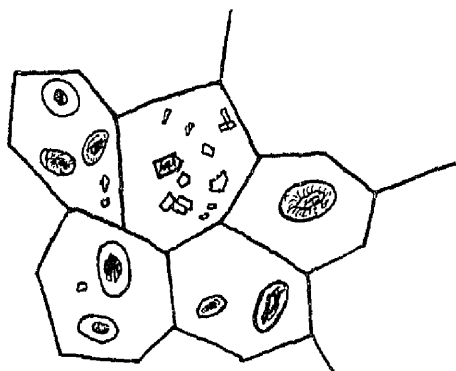



Fig. 123a. Fällung von Koffein mit Brombromkalium in Kolasamen (Mosimann)

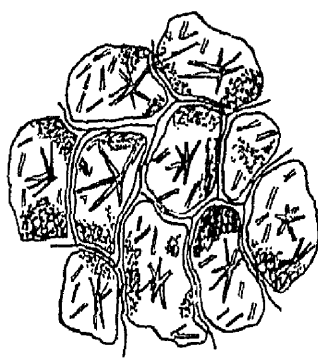



Fig. 123b. Koffein-Silikowolframat in Endospermzellen von Coffea arabica-Samen (Mosimann)

dem sich unter günstigen Umständen Prismen (s. Fig. 123b) bilden, mit ersterem entstehen prismenförmige Kristalle, die oft in Gruppen angeordnet sind. (Fig, 123a).

Bei fetthaltigen Gegenständen (Samen) empfiehlt sich vorherige Entfettung mit Petroläther.

In Coffea arabica wies Gaucher[3]) Coffein im Gewebe mit einer gesättigten Lösung von Ammoniummolybdat und Chlorammonium nach, welche mit Coffein einen weißen Niederschlag gibt, der sich beim Erwärmen löst und bald blaue Färbung annimmt. Es ließ sich außerdem eine wässerige Lösung von Ammonium vanadinicum (1 : 40) benutzen, die mit Coffein in salzsaurer Lösung eine geringe Trübung

[1]) E. Schaer, Über Alkaloid-Reaktionen mit Perhydrol, Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 458.

[2]) L. Rosenthaler u. M. Mosimann, Über das gemeinsame Vorkommen von Alkaloiden und Tanniden, Schweiz. Apoth.-Ztg., 1924, LXII, S. 13.

[3]) Gaucher, Mikrochemischer Nachweis von Coffein, Rép. de Pharm., 1895, S. 341, und: De la caféine et de l'acide cafétannique dans le caféier (Coffea arabica L.). Rech. microscopiques, Montpellier, 1895.

verursacht, aus der beim Verdunsten ein roter Rückstand entsteht. Gewächshauspflanzen zeigten Coffein im Mesophyll und im Embryo des Samens. Junge Pflänzchen, die noch kein Chlorophyll aufwiesen, waren alkaloidfrei.

Rosenthaler und Mosimann erhielten in den Endospermzellen von Coffea arabica mit Brombromkalium + Salzsäure und Silikowolframsäure + Salzsäure die oben beschriebenen Kristallbildungen.

In der Silberhaut von Coffea arabica und liberica wies Grogg das Coffein durch Sublimation nach.

Bei Cola (Kotyledonen) scheint es nach Tschirch und Oesterle (Anat. Atlas, S. 350), daß „gewisse Zellen reicher an Coffeintannat sind als andere", denn beim Einlegen frischer Schnitte in Osmiumsäure färben sich regellos zerstreute Zellen des Grundgewebes tiefer als die übrigen. „Erwärmt man einen Schnitt mit einem Tropfen Kalilauge und läßt nach Beiseiteschieben des Schnittes eintrocknen, so kristallisieren feine isolierte Nädelchen von Coffein aus."

Rosenthaler und Mosimann erhielten mit Brombromkalium + Salzsäure in den Zellen der Kotyledonen die für Coffein charakteristischen Kristalle.

In Thea bemühte sich DuPasquier die Basen in der Zelle nachzuweisen, indem er Mikrotomschnitte frischen Materials (Blattschnitte von 20 μ Dicke) solange mit Wasser auswusch (15—20 Minuten), bis das Waschwasser nicht mehr mit Ferrichlorid reagierte, bis also aller freier Gerbstoff entfernt war. Dann kamen die Schnitte in ein Gemisch von Salzsäure und Goldchlorid; ein gelbbrauner Niederschlag zeigte Coffein an. Gleich dicke nicht gewässerte Schnitte zeigten den Niederschlag, jedoch weit stärker, an der gleichen Stelle. Kristalle waren nicht entstanden. Weevers hat gegen die Methode an sich Einwand erhoben, die Ergebnisse dürften aber zu recht bestehen. Im Blatte finden sich die Basen: in den Palisaden und im Schwammparenchym; im Mittelnerv: in den Markstrahlen, in vereinzelten Zellen des Phloems und im subepidermalen Collenchym; wahrscheinlich in Spuren auch in den Schließzellen. Im Stengel versagte die Methode. Der Gerbstoff ließ sich von den Basen nicht durch Auswaschen der Schnitte trennen. Ohne Auswaschen trat die Reaktion ein im Rindenparenchym, sehr schwach in den Markstrahlen des Holzes. Ähnlich verhielt sich die Wurzel. Diese Befunde stimmen mit den von Nestler mittels der Sublimation erhaltenen überein. Dadurch ist die Ansicht von Suzuki[1]) widerlegt, der den Sitz der Alkaloide in die Epidermis verlegte.

[1]) N. Suzuki, On the localisation of theïne in the tea leaves, Tokyo, Imp. University, 1901, IV, S. 277.

Suzuki legte Schnitte einerseits in eine 0,5proz. Coffeinlösung zum Nachweis des Gerbstoffes, anderseits auf 2 Tage in eine 3,5proz. Tanninlösung zur Alkaloidermittelung. Der Gerbstoff war in den Palisaden und im Schwammparenchym lokalisiert. Mit Tannin traten Fällungen in der Epidermis auf; wahrscheinlich handelt es sich um Eiweiß, doch sollten die Fällungen im Gegensatz zur Eiweißfällung in verdünntem Ammoniak löslich sein. Welcher Körper hier in Reaktion tritt, ist bisher nicht nachgeprüft worden. Im Samen soll kein Alkaloid sein[1]); es entsteht erst bei der Keimung.

Bei den Samen von Thea sinensis L. fand Grogg Coffein in der Nährschicht der Samenschale, bei denen von Thea assamica in der unter der Hartschicht liegenden, von dieser sich leicht ablösenden Samenhaut, welche der Nährschicht der Samenschale entspricht. Rosenthaler und Mosimann fanden es in demselben Samen in der Gefäß- und Pigmentschicht.

Bei den Samen von Paullinia cupana konnten dieselben das Coffein direkt sowohl in der Samenschale (Epidermis, Palisaden, Nährschicht) nachweisen, als auch im Endosperm. Grogg erhielt es durch Sublimation aus der Nährschicht.

In dem Kakaosamen ist es bisher nicht möglich gewesen, die Lokalisation von Theobromin und Coffein direkt zu ermitteln.

Caricaceae

Carpain

Alkaloid der Blätter von Carica papaya L. (Greshoff, van Rijn) und wahrscheinlich auch von *Vasconcellea hastata* (Wester)[2]).

Bitter schmeckende farblose, monokline Prismen (F. 121° korr.). Unlöslich *in Wasser, leicht löslich in Weingeist, Chloroform u. dgl.*

Carica papaya. Alkaloidreaktion im Blatt in der Epidermis, schwächer im Schwammparenchym; in den Nerven auch in den ersten 5—6 Collenchymschichten. Im Stengel führt die Epidermis Alkaloide, weniger die nächstfolgende Schicht von Parenchymzellen. In jüngeren Blättern ist die Reaktion stärker als in älteren; gelbe Blätter enthalten kein Alkaloid mehr.

Vasconcellea hastata. Blatt: Besonders in der Epidermis und im Hauptnerv; im Blattstiel: Epidermis, einige Rindenparenchym- und fast alle Markzellen. Stengel: Epidermis und, wenn schon verkorkt, die nächstfolgenden 1—2 Phellodermschichten, viele Rindenparenchymzellen, die Stärkescheide, vereinzelte Markstrahlzellen und fast alle Markzellen.

[1]) N. Suzuki, Contribution to the physiological knowledge of the Teaplant Bull. Coll. Agric. Tokyo, 1901, IV, Nr. 4.

[2]) D. N. Wester, Lokalisation einiger Alkaloide, Ber. deutsch. pharmaz. Ges., 1914, XXIV, S. 125.

Das Alkaloid findet sich ferner in der Epidermis der Blütenkrone, des Fruchtknotens und des Samens. Auch das innere Gewebe des Fruchtknotens war sehr alkaloidhaltig. Aus den gelben Blättern war das Alkaloid gewöhnlich verschwunden.

Punicaceae

Punica granatum

In Punica granatum sind in der Rinde des Stammes und der Zweige (bis 0,7 %, meist 0,09—0,3 %), sowie in der der Wurzel (bis 1,1 %, meist 0,2—0,3 %) Alkaloide zugegen (Pelletierin, Isopelletierin, Pseudopelletierin, Methylisopelletierin); Pelletierin ist eine farblose Flüssigkeit, leicht löslich in Weingeist, Äther und Chloroform, auch in Wasser löslich.

Einige mikrochemische Angaben, die auf die Alkaloide in der Droge hinweisen, machen Tschirch und Oesterle (Anat. Atlas, 1900, S. 85). Danach findet sich Pelletierintannat, resp. die Granatgerbsäure in den Zellen „der primären Rinde, in den Rindenstrahlen und in dem Phloemparenchym. Ihr Inhalt wird durch Kaliumpyrochromat tief rotbraun, durch Kaliumwismutjodid rotbraun, durch Phosphormolybdänsäure erst blutrot, dann rotbraun, durch Eisenchlorid blauschwarz, durch Kali tief orangerot". Die innersten jüngsten Schichten der sekundären Rinde werden durch Phosphormolybdänsäure gelblich, durch Kalkwasser orangegelb gefärbt. „Legt man einen Schnitt in Sublimatlösung, so beobachtet man nach dem Eintrocknen zahlreiche bräunliche, quadratische Kriställchen, konzentrierte Schwefelsäure färbt braungelb, Goldchlorid wird reduziert und der Schnitt erscheint am Rande vergoldet."

Rosenthaler und Mosimann verwandten zur Lokalisationsermittlung Silikowolframsäure + Salzsäure, und Brombromkalium + Salzsäure. Sie fanden Alkaloid in den meisten Zellen des Rindenparenchyms, in den Rindenstrahlen und im Kork. Das Holz führte Alkaloid besonders im Mark und den Markstrahlen.

Im Blatt wiesen sie Alkaloid nach namentlich in der unteren Epidermis, in einigen Zellen der oberen Epidermis, in dem Nervenparenchym und zahlreichen Palisadenzellen.

Umbelliferae

Conium maculatum

Coniin (Propylpiperidin), (Giesecke, 1827, Geiger, 1831, Ladenburgs Synthese, 1886), ist in reinem Zustande eine farblose, ölige, nach Mäuseharn riechende Flüssigkeit, Kp. 166°, die bei Luftzutritt schnell dunkelgelb wird. Schwer in Wasser, leicht in Weingeist, Äther und Chloroform löslich. Es ist das Hauptalkaloid von Conium maculatum. (Blühende Pflanze 0,03—0,18, Blätter 0,09,

Früchte unreif bis 2,6, reif bis 1,12 %). Barth hat mikrochemisch bei gekeimten Coniumfrüchten eine Abnahme an Alkaloid festgestellt, die er (irrtümlicherweise) auf einen Verbrauch zurückführte. Anema ermittelte in der Epidermis der Plumula bei ganz jungen Keimpflänzchen Neubildung und von Tunmann vorgenommene Keimversuche zeigten, daß die Alkaloide bei im Dunklen gezogenen Keimpflänzchen nach mikrochemischer Schätzung mindestens ebenso reichlich auftreten als in belichteten Pflanzen.

Die ersten Keimstadien und Pflänzchen enthalten ungefähr gleichviel Coniin als der gekeimte Same. Erst in den älteren Pflanzen (sieben Wochen alt) steigt der Koniingehalt an (Klein und Herndlhofer).

Die ersten Autoren, die sich mit der Ermittlung der Lokalisation des Coniins beschäftigten (Anema[1]), Rosoll[2])), wandten als Reagens Jodjodkalium an, welches eine dunkelbraune Fällung verursacht, die Rosoll in Natriumhyposulfit löste, der auch zum Vergleich — Schnitte heranzog. Clautriau[3]) benutzte außerdem Jodkaliumquecksilberjodid und Phosphormolybdänsäure (letztere gibt einen sehr feinen Niederschlag, der durch Zusatz von Jodjodkalium sichtbarer gemacht werden kann) und Elfstrand[4]) noch Vanadinschwefelsäure (Blaufärbung), Kaliumwismutjodid (körnige, gelbe Fällung), Pikrinsäure (farblose Fällungen), Osmiumsäure (Blaufärbung) und Gerbsäure. Schließlich hat Barth[5]) noch herangezogen Goldchlorid und Bromwasser (brauner Niederschlag), sowie Brom- und Salzsäuredämpfe (sehr kleine, nicht doppelbrechende Kristalle). Herder[6]) ließ die Schnitte einige Stunden in Baryumquecksilberjodidlösung liegen, wusch mit Wasser aus und brachte sie dann in „eine 0,5proz., mit ein paar Tropfen Salzsäure angesäuerte Kaliumbichromatlösung, die mit 30proz. Chloralhydratlösung hergestellt war". Alkaloid-

Fig. 124. Conium maculatum, Blatt (Querschnitt), Alkaloidfällung mit Brombromkalium in beiden Epidermen (Tunmann)

[1]) P. Anema, Sitz der Alkaloide in narkotischen Pflanzen, Neederl. Tijdschr. voor Pharm., 1892, S. 212.

[2]) A. Rosoll, Über den mikrochem. Nachweis von Curcumin und Coniin in den vegetabilischen Geweben, Progr. Niederöster. Landes-Oberrealschule in Wiener Neustadt, 1894, XXIX, S. 1.

[3]) G. Clautriau, Localisation et signification des alcaloides dans quelques graines, Bruxelles, A. Manceaux, 1894 u. Ann. d. l. Soc. Belge d. Microsc., 1894, XVIII, S. 35.

[4]) M. Elfstrand, Studier öfer alkaloidernas lokalisation, företrädesvis inom familjen Loganiaceae, Upsala Universitets Årsskrift, 1895.

[5]) H. Barth, Dissertat., Zürich, 1898, S. 17.

[6]) M. Herder, Über einige neue allgemeine Alkaloidreagentien und deren mikrochemische Verwendung, Dissertation, Straßburg, 1905, S. 53.

zellen sollen gelbe Färbung annehmen. Die besten Reaktionen erhält man mit Jodjodkalium, Brombromkalium, auch mit Goldchlorid und Silikowolframsäure. Die kristallinischen Ausscheidungen bei Salzsäuredämpfen sind sehr schwer zu erkennen.

Klein und Herndlhofer[1]) bevorzugen zum Nachweis des Coniins das Chloranil (1proz. Lösung in Benzol), das mit Coniin dunkelgrüne wetzsteinförmige, bei langsamer Bildung fast immer einzeln auftretende Kristalle (F. 95°) gibt. Hat man eine Coniinlösung, so gibt man sie am Objektträger in einen Glasring, versetzt mit einem Tropfen Natronlauge und bedeckt den Glasring mit einem Deckglas, das auf der Unterseite einen Tropfen Chloranillösung trägt. Erfassungsgrenze 1 γ in Verdünnung 1 : 100000. Der Glasring muß dicht schließen (Rand des Ringes abschleifen oder mit Vaseline bestreichen), das Deckglas rasch aufgesetzt werden, ehe das Benzol verdunstet. Zur Prüfung von Pflanzenmaterial bringt man es zerrieben in den Glasring und versetzt mit Natronlauge.

Über die Lokalisation der Alkaloide in Conium maculatum ist bisher folgendes ermittelt: Coniin findet sich in den vegetativen Teilen ausgewachsener Pflanzen nur in der Epidermis (Fig. 124); ferner findet es sich in allen meristematischen Zellen der Vegetationsspitzen, sowie nach Rosoll im Phloemparenchym (in 3 mm starken Stengelteilen fand Tunmann es dort nicht). In der Wurzel ist auch das subepidermale Rindenparenchym alkaloidhaltig. Die Angaben über die Lokalisation in nicht ganz reifen Früchten weisen Unstimmigkeiten auf. Die Hauptmenge tritt nach der übereinstimmenden Ansicht aller Autoren in den sogenannten Alkaloidschichten der Fruchtwand auf, Endosperm und Embryo sind alkaloidfrei. Anema gibt es außerdem für die Epidermis und für viele Parenchymzellen an, nach Clautriau führen auch die die Bündel begleitenden Zellen Alkaloide. Tschirch und Oesterle finden Coniin in der gesamten Fruchtwand, vornehmlich in der Epidermis und in der Coniinschicht. In letzterer werden die Reaktionen modifiziert, möglicherweise durch Methylconiin, Conhydrin, Conylen oder durch einen ölartigen Körper. Andererseits spricht Barth die Epidermis für alkaloidfrei an und findet die Alkaloide in Übereinstimmung mit Clautriau, nur sollen die Alkaloide sich auf die Parenchymzellen der Außenseite der Bündel beschränken.

Um diese Widersprüche zu klären, wurden die verschiedenen Entwicklungsstadien von der Blüte bis zur Fruchtreife untersucht, wobei sich zeigte, daß tatsächlich die Epidermis Alkaloide führt. In den

[1]) G. Klein u. E. Herndlhofer, Der Nachweis von Coniin, Österr. bot. Zeitschr., 1927, LXXVI, S. 229.

jüngsten Stadien ist in der Epidermis wohl ebenso viel Alkaloid enthalten als in der Coniinschicht. Im Laufe der Entwickelung schwindet in der Epidermis das Coniin immer mehr. Es hängt also lediglich vom Stadium der Entwicklung ab, ob man in der Epidermis Alkaloidreaktionen erhält oder nicht. Übrigens lieferte bei diesen Untersuchungen mehrwöchentliches Einlegen halbierter Früchte in konzentrierte wässerige Kupfersulfatlösung keine besseren Resultate als Brombrom- oder Jodjodkalium. Goris[1]) gibt Alkaloid an für die Zellen des Epikarps und die Papillen.

Goris hat die Lokalisation auch im Blütenstiel studiert. Er fand Alkaloid in der Epidermis und den subepidermalen Schichten, ein wenig im subepidermalen Collenchym, im Siebteil und einigen Zellen des Holzparenchyms. Auch die Randzelllen der Sekretbehälter enthalten Alkaloid. In der fruktifizierenden Pflanze findet man noch Alkaloid in der Epidermis der Stiele der Döldchen und (weniger) der Dolde, nichts dagegen im Fruchtstiel.

Loganiaceae

Gelsemium

In Gelsemium sempervirens Ait. finden sich mehrere Alkaloide im Rhizom: 0,17—0,2 % Sayre [Pharm. Journ. 1911, S. 242], 1,2 % Moore [Journ. chem. soc. 1910, XCVII, S. 2223]. Das Hauptalkaloid ist das Gelsemin. Seidenglänzende rosettenförmig zusammengelagerte Nadeln, F. 160°. Schwer löslich in Wasser, leicht in Weingeist, Äther und Chloroform. Löslich auch in Alkalien.

Elfstrand[2]) gebrauchte zum Nachweis der Gelsemiumalkaloide Jodjodkalium (rotbrauner Niederschlag), konzentrierte Schwefelsäure und Kaliumdichromat (rote, nicht grün werdende Färbung), konzentrierte Salzsäure und konzentrierte Salpetersäure (Kristallbildungen); am besten geeignet erwies sich Vanadinschwefelsäure (rote, langsam grün werdende Färbung), in günstigen Fällen ließen sich beide Alkaloide mit Salpetersäure unterscheiden, Gelsemin gab keine, Gelseminin eine grüne Färbung. Boelling (Lit. S. 499, 1) benutzte außerdem Chlorzinkjod und Kaliumwismutjodid (roter Niederschlag), Platinchlorid, Goldchlorid, Pikrinsäure, (gelbliche Fällungen), Phosphormolybdänsäure (gelbweiße Trübung), Kaliumquecksilberjodid, Tannin, Bromwasser (grauweiße Trübungen). In den alkaloidhaltigen Zellen rief Molybdänschwefelsäure (mit gleichem Teile Wasser verdünnt) eine blaue Färbung hervor. Joddämpfe bilden einen körnigen braunen Niederschlag, Dämpfe von Salpetersäure nach 12 Stunden nadel-

---

[1]) Goris, Localisation usw. S. 119.

[2]) M. Elfstrand, Studier öfver alkaloidernas lokalisation, företrädesvis inom familjen Loganiaceae, Upsala, Universitets Årsskrift, 1895.

förmige Kristalle. Letztere sah Tunmann im polarisierten Lichte mit gelben Farben aufleuchten, die kleineren isoliert liegenden Nädelchen in den Zellen; außerdem haben sich größere Kristallgruppen auf den Präparaten abgeschieden. Je länger die Schnitte in Öl liegen, um so zahlreicher erscheinen die großen Kristallgruppen (Fig. 125). Die Schnitte selbst sind tief chromgelb gefärbt.

Im Blatte kommen nach Elfstrand die Alkaloide in der Epidermis und in der Nähe der Gefäßbündel vor, nach Boelling auch im Siebteil der Mittelrippe. Im Stamm fand sie Elfstrand in der primären und sekundären Rinde, im inneren Leptom und in der Stärkeschicht des Markes; Boelling gibt im Gegensatz hierzu die Hauptmenge im äußeren Siebteil an, ferner sind primäres Rindenparenchym, inneres Phloem, aber auch Markstrahlen und Holzparenchym alkaloidhaltig.

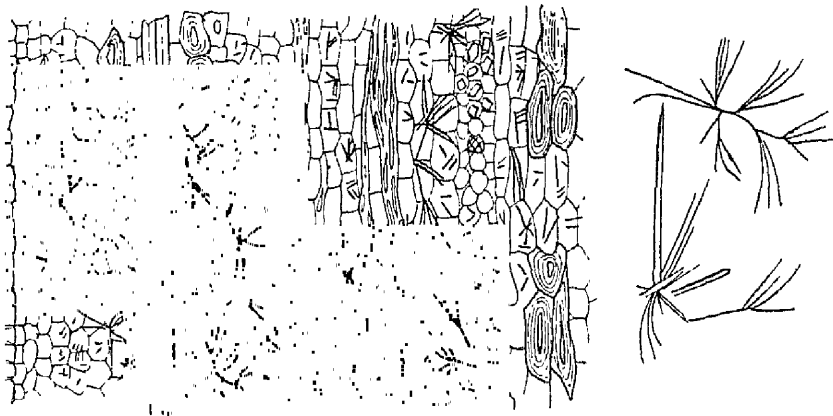



Fig. 125. Gelsemium sempervirens (Rhizom, Längsschnitt), Präparat 12 Stunden in Salpetersäuredampf, dann 2 Stunden in Paraffin, im Markstrahl einige Oxalate eingezeichnet (Tunmann)

Und auch in der Wurzel treten sie vorzugsweise im äußeren Phloem auf, doch sind „die Markstrahlen des Holzes und das Holzparenchym nicht ganz alkaloidfrei". Beide Alkaloide sind in den gleichen Zellen lokalisiert.

In den Rhizomen und Ausläufern von Gelsemium elegans haben Gehe & Co. mehrere Alkaloide ermittelt, deren Reindarstellung noch nicht gelungen ist. Die Tartrate kristallisieren. Nach Kobert sind sie äußerst toxisch.

Zum mikrochemischen Nachweis können dienen (Tunmann)[1]: Brombromkalium, Jodjodkalium (starke braune Fällungen), Salpetersäuredampf (chromgelbe Färbung), Kaliumquecksilberjodid (Tropfen, selten Kristalle), Kalilauge (kleine Nädelchen). Soweit das dürftige Material, das bei dem Versand gelitten hatte, einen Schluß gestattet, sind die Basen lokalisiert: im gesamten Rindenparenchym, vorzugsweise in der Sklereidenzone; im Holze sind möglicherweise Spuren

[1] O. Tunmann, Tai-tsa-ju, Gehes Ber., 1910, S. 153.

in den Markstrahlen; in den Blättern war kein Alkaloid zugegen. Der Kork ist ebenfalls alkaloidfrei.

Nach den bisherigen Befunden müssen wir annehmen, daß bei Gelsemium der Kork alkaloidfrei ist, während bei Strychnos die Alkaloide in größerer Menge sich im Kork anhäufen.

Strychnos

In vielen Strychnos-Arten kommen die Alkaloide Strychnin und Brucin (1819 Pelletier u. Caventou) vor, in den Samen von Strychnos nux vomica außerdem das Vomicin (E. Gmelin 1929).

Strychnin. Rhombische Prismen F. 268°. Schwer löslich in Wasser, leicht in Chloroform, weniger leicht in Weingeist, Benzol und Äther.

Brucin. Monokline Prismen, Blättchen oder blumenkohlähnliche Massen. F. 178°. Löslich in 300 Teilen Wasser, 2 Teilen Weingeist, sehr leicht in Chloroform, sehr schwer in absolutem Äther.

Die beiden Alkaloide kommen nicht in allen Strychnos-Arten vor, sie fehlen in Str. potatorum L. fil. (Samen), Str. laurina Wall. (Blatt, Holz), Str. monosperma Miq. (Blatt, Rinde), Str. spinosa (Frucht) soll nur zuweilen giftig sein. In einigen Fällen wurde teils nur Strychnin, teils nur Brucin gefunden; Str. nux vomica: Samen (2,74—5,34 % Gesamtalkaloid, davon 47,16 % Strychnin und 52,84 % Brucin, C. C. Keller), Fruchtfleisch (1,4 % Strychnin, 1 % Brucin, Dunstan u. Short), Blätter (0,354 % Brucin, kein Strychnin, Hooper), Holz (0,2285 % Strychnin, 0,077 % Brucin, D. Steiger), Rinde (1,6 % fast nur Brucin, Beckurts, 6,4 % Gesamtalkaloid, Smith, junge Rinde 3,1 %, ältere Rinde 1,68 % Brucin, Greenish), ältere Wurzeln (0,99 % Gesamtalkaloid, und zwar 0,71 % Strychnin und 0,276 % Brucin, Herder): Str. ligustrina: Holz (2,26 % nur Brucin), Rinde (7,38 % Brucin, Greenish); Str. colubrina: Holz (0,96 %), Rinde (5,54 % Gesamtalkaloid, Greenish), Holz und Rinde von Blay-Hitam-Str. führen (Boehm) nur Brucin; Str. tieuté: Samen (1,5 % Strychnin, Brucin in Spuren, Moens). Str. quaqua Gilg: Samen (0,026 % Brucin, kein Strychnin, Sievers).

Heckel faßte die Samenalkaloide als Baustoffe auf. Tunmann[1]) kam zu nachstehendem Ergebnis: Die Endospermalkaloide lassen sich während der Keimung außerhalb des Keimlings verfolgen. 1/3 gelangt durch Auslaugung ins Erdreich (Schutz der Keimwurzel?), 1/5 wird mit den Samenschalen abgeworfen, weitere Mengen überziehen die jugendlichen Keimblättchen in Form eines schleimigen Belages, der sehr fest haftet (möglicherweise als Schutz gegen Tierfraß dient, was um so notwendiger erscheint, da die Keimblätter lange Zeit die einzigen Assimilationsorgane sind). Nitrate entnimmt die Keimpflanze dem Boden. In der jungen Pflanze entstehen die Alkaloide unabhängig vom Lichte und vor dem Auftreten des Chlorophyllgrün und der Oxalate. Junge Laubblätter führen Alkaloide. Prozentgehalt an Gesamtalkaloid: Samen aus Saigon 2,98, abgeworfene

[1]) O. Tunmann, Über die Alkaloide in Strychnos nux vomica L. während der Keimung, Arch. d. Pharm., 1910, CCXLVIII, S. 644.

Samenschalen 2,11, junge Keimwurzeln 4,48, ältere Keimwurzeln 3,72, hypokotyle Achsen 2,43, junge, noch gelbe Kotyledonen 6,62, ältere grüne Kotyledonen 4,65.

Bei Keimungsversuchen beobachteten Sabalitschka u. Jungermann[1]) folgendes: Zunächst sinkt sowohl der prozentische wie der absolute Alkaloidgehalt, ohne daß Alkaloid nach außen austritt. In einem zweiten Stadium (nach 215 Tagen) steigen absoluter und prozentischer Alkaloidgehalt und übertreffen dann die Werte der ursprünglichen Samen. Die ersten Laubblätter und die Keimblätter haben einen weit höheren prozentualen Alkaloidgehalt als die übrigen Teile der jungen Pflanze.

Die Alkaloide verschwinden aus den Samenrückständen nach der Entfaltung der Keimblätter nicht gänzlich; es geht ungefähr ein Fünftel des ursprünglich in den Samen vorhandenen Alkaloids bei dem Abfallen der Samenreste verloren.

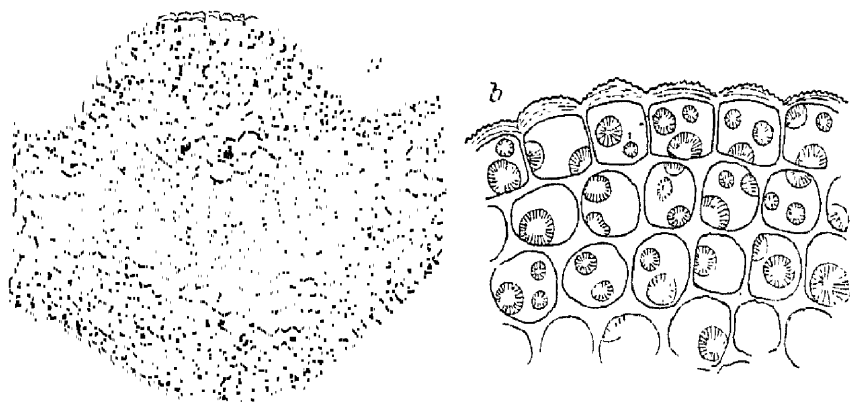



Fig. 126. Strychnos nux vomica, 3 cm langes Keimblatt, Hauptnerv. Fällung mit Kaliumquecksilberjodid. a) Übersichtsbild, b) Epidermis und angrenzendes Kollenchym (stärker vergrößert)

Die meisten Autoren studierten den Nachweis der Strychnos-Alkaloide im Samen, vorzugsweise in dem von Strychnos nux vomica. Lindt[2]) benutzt zum Nachweis von Brucin eine mit Selensäure versetzte Salpetersäure (auf 5 Tropfen Selensäure von 1,4 spez. Gewicht 1—2 Tropfen Salpetersäure von 1,2 spez. Gewicht). Strychnin wird mit einer konzentrierten Lösung von schwefelsaurem Ceroxyd in Schwefelsäure (das Salz muß im Überschuß der Schwefelsäure zugesetzt sein, die Lösung ist haltbar) nachgewiesen. Mit diesen Reagentien wird Brucin orange, Strychnin violettblau. Ausgehend von der Ansicht, daß fette Öle die Reaktionen beeinflussen, wurden aus den Präparaten durch Mazeration mit Petroläther oder mit absolutem Alkohol die Fette zuvor entfernt. Durch den Alkohol sind wohl Alkaloide aus dem Zell-

[1]) Th. Sabalitschka u. C. Jungermann, Der absolute und prozentuale Alkaloidgehalt der einzelnen Teile der Keimlinge und der jungen Pflanze von Strychnos nux vomica L. während der Keimung, Biochem. Zeitschr., 1926, CLXVII, S. 479.

[2]) O. Lindt, Über den mikrochemischen Nachweis von Brucin und Strychnin, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, S. 237.

inhalte in die Membran verschleppt worden und so verlegt Lindt (irrtümlicherweise) den Sitz der Alkaloide bei den Samen von Strychnos nux vomica und Str. ignatii Berg in die dicken Wände des Endosperms. Durch Alkohol werden überdies die Alkaloide gelöst, und nur infolge zu kurzer Einwirkung waren sie noch nachweisbar.

Zur gleichen Zeit benutzte Rosoll[1]) konzentrierte Schwefelsäure zum Nachweis der Alkaloide im Samen von Strychnos nux vomica und Str. potatorum. Daß er Str. potatorum für alkaloidhaltig ansah, beruht auf unrichtiger Beobachtung. Beim Eintragen der Präparate des Endosperms in Schwefelsäure wurde der Inhalt gelb, dann schnell zwiebelrot, die dicken Membranen lösten sich ohne Farbenreaktion (sind also alkaloidfrei), die austretenden Fetttropfen sind farblos, werden aber bei Zusatz eines sehr kleinen Körnchens von Kaliumdichromat violett. Gerock und Skippari[2]) legen die Präparate auf mehrere Stunden in Kaliumquecksilberjodid (Fig. 126), übertragen sie nach wiederholtem Auswaschen mit Wasser in Schwefelwasserstoffwasser und beobachten in Glyzerin (schwarze körnige Fällung). Clautriau (Lit. S. 512, 3) benutzt Jodjodkaliumlösung bei Zusatz von Ammoniumkarbonat. Sauvan[3]) untersucht außer Strychnos nux vomica noch die Samen von Str. ignatii und Str. gaultheriana und verwendet salpetersäurehaltige Schwefelsäure sowie eine gesättigte Lösung von Ceriumsulfat in 75proz. Schwefelsäure (violette Färbung). Zur Entfernung des Brucins wird Kaliumdichromat benutzt, das mit Strychnin ein unlösliches, mit Brucin ein lösliches Salz bildet. Die Präparate werden zur Entfernung des Brucins mit 20proz. wässeriger Kaliumdichromatlösung mazeriert, dann wird auf Strychnin geprüft. Elfstrand (Lit. S. 512, 4) weist Brucin mit rauchender Salpetersäure, Strychnin mit Vanadinschwefelsäure (violette Färbung) nach. Letztere Reaktion soll einen annähernden Schluß auf die Menge des anwesenden Strychnins gestatten. Nach Tschirch und Oesterle (Anat. Atlas, S. 152) eignet sich für den Strychninnachweis „das Cer am wenigsten, das Vanadin am besten". Beim Brucinnachweis erhöht ein Zusatz von Salzsäure zur Salpetersäure die Lebhaftigkeit der orangegelben Färbung. Salpetersäurehaltige Selensäure wirkt nicht besser als Salpetersäure allein.

---

[1]) A. Rosoll, Beiträge z. Histochemie d. Pflanzen, Sitzgsber. Wien. Akad., 1884, LXXXIX, S. 137.

[2]) J. E. Gerock und F. J. Skippari, Über den Sitz der Alkaloide im Strychnossamen, Arch. d. Pharm., 1892, CCXXX, S. 555.

[3]) M. L. Sauvan, Untersuchungen über die Lokalisation von Brucin und Strychnin in den Samen von Strychnos nux vomica u. a., Journ. de Bot., 1896, X. S. 133.

Die allgemeinen Alkaloidreagentien wurden erst 1898 von Barth (S. 47 in der S. 439, 6 gen. Dissert.) benutzt. Platin- und Goldchlorid geben gelbweiße fein kristallinische Niederschläge, Ferrocyankalium und Salzsäure ($^2/_3$ und $^1/_3$ 25proz. Salzsäure), ferner Bromwasser, Pikrinsäure, Quecksilberchlorid, Natronlauge, Natriumkarbonat, Rhodankalium und Kaliumwismutjodid (Fig. 127) geben mehr oder weniger deutlich kristallinische Ausscheidungen. Str. potatorum L. fil., Str. spinosa Lam. waren alkaloidfrei, hingegen gelang der Nachweis bei Samen von Str. ignatii, Str. spinosa Harvey und Str. tieuté. Später wandte Herder (S. 39 in der S. 432 gen. Dissert.) in 30proz. Chloralhydratlösung sowohl Caesiumquecksilberjodid (Empfindlichkeits-

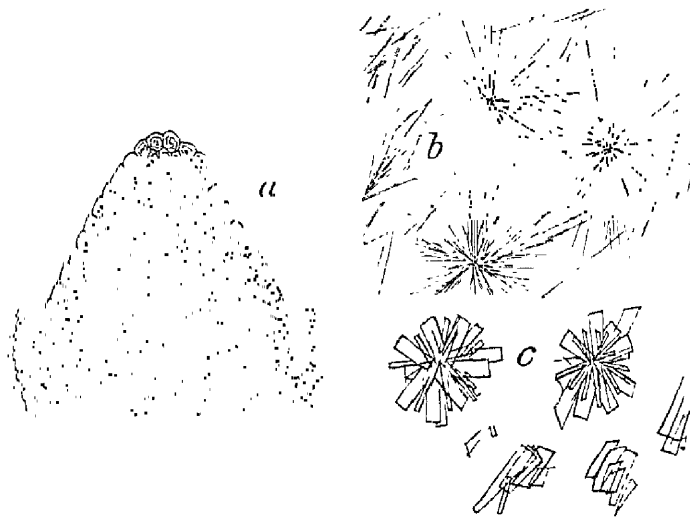



Fig. 127. Strychnos nux vomica, Fällungen mit Kaliumwismutjodid, a) Plumula mit Ansatzstellen der Keimblätter, b) mit Brucin, c) mit Strychnin

grenze für Strychnin 1 : 40000, für Brucin 1 : 10000), als auch Baryumquecksilberjodid (Strychnin 1 : 43000, für Brucin 1 : 11000) an. Diese Niederschläge sind aber schwer zu erkennen.

Zum mikrochemischen Nachweis verwandte R. Klein[1]) die Pikrolonsäure, die mit Strychnin lange stumpfe zu Büscheln vereinigte hellgelbe Nadeln bildet. Erwärmen eines Schnittes durch das Strychnos-Endosperm mit wässeriger Pikrolonsäure läßt den Niederschlag meist an den Membranen, seltener in der Mitte entstehen. Mit wässeriger Pikrinsäure erhält man kleine Kristalle an den Zellwänden und Büschel im Zellinnern.

Im Embryo fand er entgegen Tunmann und Wasicky neben Brucin Strychnin.

[1]) R. Klein, Über den mikrochemischen Nachweis von Strychnin und Brucin im Samen von Strychnos nux vomica, Anz. Kais. Akad. Wiss. Wien. math. naturw. Kl. III, 1914, S. 39.

Wasicky[1]) empfiehlt zum Nachweis von Strychnin und Brucin in erster Linie Pikrolonsäure. Man verrührt eine kleine Menge der Säure mit kaltem Wasser und erwärmt etwas, bis das Wasser eine gelbe Farbe annimmt. Nach einem halben Tag filtriert man ab.

Man erhält die schönsten Kristalle, wenn man den zu untersuchenden Tropfen teilt, zu der einen Hälfte das Reagens setzt, schwach erwärmt, dann die andere Hälfte hinzufügt und wieder leicht erwärmt. Mit Strychninnitrat erhält man zunächst einen kleinkörnigen Niederschlag und daraus kleine schlanke doppelbrechende Nadeln, die zu schwach gelblich gefärbten, zierlich dendritisch verzweigten Gebilden heranwachsen. Mit Brucinsulfat entsteht ein flockiger Niederschlag, der bei leichtem Erwärmen in Rosetten und Sterne aus rhombischen oder deltoidähnlichen Tafeln übergeht. Oft machen die Aggregate den Eindruck eines am Rande gezackten Blattes. In der Mischung von Strychnin und Brucin fallen beim vorsichtigen Erwärmen Kristallnadeln von Strychninpikrolonat aus, die nicht so schlank sind wie aus Strychninlösung allein; auch fehlen die Dendriten. Das Brucin erscheint als kleine, häufig zu Rosetten gruppierte Würfel.

Die Kristalle fallen deutlicher aus, wenn man dem Reagens ein klein wenig Glyzerin zusetzt oder eine gesättigte Lösung von Pikrolonsäure in einer Mischung von 20 g Weingeist und 60 g Wasser verwendet. Man sieht dann beim Erwärmen außer Sternen und Büscheln von Strychninnadeln das Brucinpikrolonat in Form kurzer dreiseitiger Prismen, würfel- und pyramidenähnlichen Kristallen, die oft zu 3—4 eine Rosette bilden. In Weingeist sind die Brucinkristalle zum Unterschied von denen des Strychnins leicht löslich. Zum Nachweis in Schnitten kann man die gesättigte wässerige Lösung benutzen. Auch mit diesem Reagens fand Wasicky die Alkaloide im Ölplasma der Endospermzellen lokalisiert. Im Embryo fand er nur Brucin.

Klein und Herndlhofer[2]) verwenden zum Nachweis von Strychnin und Brucin außer der Extraktion (im Kleinschen Extraktionsapparat) die Mikrosublimation (im Klein-Wernerschen Mikrosublimationsapparat). Das Strychnin weisen sie — auch im Schnitt — mit salzsaurer Ferrocyankaliumlösung (10proz.) nach, mit der Strychnin allein flügelartige Gebilde[3]), im Gemisch mit Brucin Fiedern bildet.

---

[1]) R. Wasicky, Der mikrochemische Nachweis von Strychnin und Brucin im Samen von Strychnos nux vomica L., Zeitschr. allg. österr. Apoth.-Verein, 1914, LII, S. 41.

[2]) G. Klein u. E. Herndlhofer, Der Nachweis von Strychnin und Brucin, Österr. bot. Zeitschr., 1927, LXXVI, S. 89.

[3]) In Wirklichkeit entstehen Nadeln und Stäbchen, die teils isoliert sind, teils zu mannigfachen Aggregaten zusammentreten.

Die Schnitte werden erst mit einem Tropfen 5proz. Salzsäure, dann mit der Kaliumferrocyanidlösung versetzt.

Brucin wird in den Sublimaten und Extrakten, nicht in den Schnitten, mit Platinchlorwasserstoffsäure nachgewiesen. Brucin gibt lange, etwas verzweigte Prismen. In dem Gemisch von Brucin und Strychnin entstehen bei ganz schwach saurer Reaktion zuerst kleine dunkelgelbe Doppelbüschel des Brucins, später Zerrformen des Strychnins.

Tunmann (l. c. S. 432, 1) erhielt beim Erwärmen von Chlorzinkjod mit Strychnin braunrote bis schwarzrote Sphärite und Drusen, die teilweise perlschnurartig aneinander gereiht sind. Bei gekreuzten Nikols leuchten sie in Rot auf.

Um Strychnin in Strychnospulver nachzuweisen[1]), verreibt man das Pulver mit 5proz. Salzsäure, zieht einen Tropfen der Flüssigkeit ab und läßt Ferrocyankaliumlösung hinzufließen. Es entstehen dann die erwähnten Kristalle. Man kann auch so vorgehen, daß man das Pulver auf dem Objektträger mit ammoniakalischem Chloroform auszieht und nach Verdunsten des Chloroforms Vanadin-Schwefelsäure hinzutreten läßt. Die Randzone färbt sich violett. Behandelt man ein anderes Präparat mit konzentrierter Salpetersäure, so treten orangerote Inseln am Rande auf (Brucin). Auch für den Nachweis als Ferrocyanid empfiehlt es sich, erst mit ammoniakalischem Chloroform auszuziehen, die Ränder, am besten nach Entfernung des Pulvers mit Salzsäure, zu verrühren und dann Ferrocyankalium zuzusetzen.

Abgesehen von dem auf fehlerhafter Präparation fußenden Resultat von Lindt, der den Sitz der Alkaloide in die Membran verlegt und zum Teil von Elfstrand und Tschirch[2]) unterstützt wird, stimmen die Ergebnisse der anderen Autoren darin überein, daß im Endosperm von Strychnos nux vomica die Alkaloide nur im Zellinhalte auftreten, nach Rosoll vorzugsweise im Öl, nach Gerock und Skippari im Ölplasma und in den Aleuronkörnern, nach Barth und Tunmann nur im Ölplasma. In den Plasmodesmen sahen Gerock und Skippari körnige Fällungen, die sie für Alkaloide hielten, Barth fand diese nicht. Die Fällungen kommen jedoch bei längerer Einwirkung der Reagentien vor (auch bei Zusatz von Jodjodkalium) und sind nach Tunmanns Ansicht die bekannten körnig-stäbigen Fällungen der Plasmodesmen (s. d.), welche mit Alkaloiden nichts zu tun haben. Die Plasmodesmen der ruhenden und keimenden Samen

[1]) L. Rosenthaler, Chemische Charakterisierung von Drogen, Schweiz. Apoth.-Ztg., 1924, LXII, S. 154.

[2]) A. Tschirch, Angew. Pflanzenanatomie, 1889, S. 130.

sind alkaloidfrei. Während im Embryo Sauvan und Clautriau, sowie R. Klein beide Alkaloide angaben, Elfstrand nur Protein und Fett fand, ist nach Barth und Tunmann nur Brucin zugegen. Doch soll nach Barth der Keimling des brucinarmen Samens von Str. spinosa alkaloidfrei sein. In Wurzel- und Stammrinde gibt Herder die Hauptmenge der Alkaloide im Kork an, dort soll nur Brucin sein, während im Innern und im Holze Strychnin überwiegt. Über die Verhältnisse während der Keimung hat Tunmann Angaben gemacht (Fig. 127 und S. 516), aus denen hervorgeht, daß die allgemein in die Literatur übergegangene Ansicht Pictets, nach der erst Strychnin entsteht, dieses in Brucin übergeführt wird (und nach dem Kork wandert) nicht den Tatsachen entspricht. Sollte die Pflanze Brucin nur aus Strychnin bilden können?

In der Rinde von Str. tieuté kommt Strychnin nur im Kork vor, Brucin fehlt[1]).

Über die Lokalisation des Strychnins in den vegetativen Teilen von Strychnos nux vomica macht Sauvan[2]) folgende Angaben:

Wurzel: Der Vegetationspunkt enthält Alkaloid in allen Elementen, nach der Differenzierung der Gewebe findet man Strychnin nur noch außerhalb des Zentralzylinders. In der älteren Wurzel findet sich das Alkaloid hauptsächlich im Rindenparenchym.

Stengel: Verteilung dieselbe wie in der Wurzel. Die Epidermis ist alkaloidfrei.

Blatt: In den Keimblättern enthalten die Epiderm- und Parenchymzellen Alkaloid; sobald sie grün geworden, findet man es nur noch in den Epidermen. Die Laubblätter enthalten Strychnin in allen Parenchymzellen und dem Siebteil der Nerven.

Dazu ist zu bemerken, daß Klein und Herndlhofer in Stengel und Blatt von Strychnos nux vomica kein Alkaloid nachweisen konnten. Identisch mit der Verteilung des Strychnins in Strychnos nux vomica ist die in Str. gaultheriana Pierre, Str. Tieuté Lesch, Str. Glaucinia Pierre, Str. colubrina L., Str. minor Blume, Str. ligustrina Blume und Str. Icaja Baill.

Curare

Curare ist ein hauptsächlich aus Strychnos-Arten (Str. Castelnaei Wedd. Str. toxifera Schomburgk und Str. Gubleri) in Südamerika dargestelltes Extrakt, das als Pfeilgift dient. Die wirksamen Bestandteile sind Alkaloide.

---

[1]) C. Hartwich u. H. Geiger, Beiträge zur Kenntnis der Ipoh-Pfeilgifte und einiger zu ihrer Herstellung verwendeter Pflanzen, Arch. d. Pharm., 1901, CCXXXIX, S. 491.

[2]) L. Sauvan, Localisation des principes actifs dans les végétaux, Journ. Bot., 1896, X, S. 126 nach Goris, Localisation usw., S. 126.

Boehm fand im Tuben-Curare Curin und Tubocurarin, im Kalebassencurare ein Curarin, im Topfcurare Protocurin, Protocuridin und Protocurarin. Im Tubencurare ist Quercit, im Topfcurare Kaliumsulfat kristallinisch abgeschieden.

Mit Titan-Schwefelsäure (0,1—0,2 g Titansulfat, 30 ccm konz. Schwefelsäure) geben die heller gefärbten Sorten rosaviolette oder violette, die dunklen nur gelbe oder bräunliche Färbungen.

Setzt man zu einer Lösung des Siusi-Curare etwas eisenchloridhaltigen Eisessig und unterschichtet mit konz. Schwefelsäure, so entsteht ein grüner Berührungsring (Lewin)[1]).

Curin (= l-Bebeerin). Farblose vierseitige Prismen. F. 221—221,5°. Unlöslich in Wasser, leicht löslich in verdünntem Weingeist und Chloroform, schwer in absolutem Alkohol, Methylalkohol und Benzol. Vanadin-Schwefelsäure färbt erst tiefschwarz, dann blau und zwiebelrot.

Tubocurarin. Amorphe braunrote Masse. Löslich in Wasser und Weingeist. Gegen Vanadin-Schwefelsäure ähnlich wie Curin.

Zum Curarinnachweis benutzte Elfstrand (Lit. S. 512. 4) konzentrierte Schwefelsäure (karminrote Färbung), konzentrierte Salpetersäure (blutrot), Vanadinschwefelsäure (rotviolett) und Sauvan (Lit. S. 518, 3) außer diesen Reagentien noch Erdmanns Reagens (rot), verdünnte Schwefelsäure (karminrot), Cersulfat-Schwefelsäure (violett). In der Rinde sind die Curarebasen im Bast, im äußeren Parenchym und im Kork, in den Blättern im Mesophyll lokalisiert, Boehm fand sie fast ausschließlich im Kork, sowohl bei südamerikanischen als auch bei asiatischen Strychnosrinden.

Solanaceae

Atropa, Datura, Duboisia, Hyoscyamus, Mandragora, Scopolia

Die in den genannten Gattungen vorkommenden Alkaloide sind Atropin, Hyoscyamin und Scopolamin[2]).

Atropin. Farblose Prismen oder Nadelbüschel. F. 115—115,5°. Schwer löslich in Wasser, leicht in Weingeist und Chloroform, gut in Äther, Essigäther und Benzol. Wird durch verseifende Agentien in Tropin und inaktive Tropasäure gespalten.

Hyoscyamin. Farblose glänzende Nadeln oder säulenförmige Prismen. F. 108,5°. Schwer löslich in Wasser, leicht in Weingeist, Äther und Chloroform. Vorsichtige Verseifung ergibt Tropin und l-Tropasäure.

Scopolamin. Farblose Kristalle. F. 59°. Leicht löslich in Weingeist u dgl., schwerer in Wasser. Verseifung ergibt neben l-Tropasäure (über Scopin) Scopolin.

[1]) L. Lewin, Über Curare und ein neues Verfahren für die Curaringewinnung, Chem. Ztg., 1923, XLVII, S. 65.

[2]) Meteloidin aus Datura meteloides ist noch nicht mikrochemisch bearbeitet.

Klein u. Sonnleitner[1]) finden für alle von ihnen untersuchten Solanaceen, daß sich die Alkaloide im Samen anreichern, bei der Keimung völlig verschwinden und im wachsenden Pflänzchen wieder auftreten. Die zuerst aufgetretene Base kann später durch eine andere ersetzt werden. So überwiegt bei Atropa belladonna im Frühjahr das Hyoscyamin, im Herbst das Atropin. Bei Hyoscyamus niger (einjährig) tritt Scopolamin als erstes Alkaloid im Keimling auf; im reifenden Samen findet sich zuerst Scopolamin, dann Hyoszyamin.

Bei sachgemäßer Kultur ist der Alkaloidgehalt ebenso groß oder größer wie in wildwachsenden Pflanzen. Von Einfluß ist außer dem Boden auch die Witterung. — Burmann erhielt bei Atropa des gleichen Standortes (Aigle, Kt. Waadt) 1907: 0,094, 1908: 0,082, 1909: 0,045, 1910: 0,046, 1911: 0,099 % Atropin. Der Gesamtalkaloidgehalt der Droge geht oft unter 0.3 % herunter, 1911 betrug er infolge der Witterung 0.336—0,606 % (Caesar u. Loretz). Selten steigt der Alkaloidgehalt auf 0,9—1,3 %. Sonnenblätter führen etwas mehr Alkaloid als Schattenblätter (Unger, Apoth.-Ztg., 1912). 3jährige Kulturpflanzen (Kalifornien) hatten 0,519 % Gesamtalkaloid (Sayre) und zwar die Blätter 0,642, jüngere Stengel 0,431, ältere Stengel 0,167 %. Wurzeln führen bis 0,5, Samen bis 0,8 %.

Nach Sievers steigt der Alkaloidgehalt der Blätter vom Frühjahr bis Mitte September und sinkt dann wieder ein wenig. Nach E. Baur ist der Alkaloidgehalt des Assimilationsgewebes am Morgen größer als am vorhergehenden Abend, während die Nervatur sich entgegengesetzt verhalten soll. Verdunklung soll den Alkaloidgehalt vermehren, nachträgliche Belichtung soll in Blatt und Wurzel Verminderung bewirken (Ripert).

Der Alkaloidgehalt der Infloreszenzachsen von Atropa belladonna nimmt von Mai bis September ständig zu, ebenso steigt der absolute Gehalt im Fruchtknoten bis zur Fruchtreife (Baur)[2]).

In Hyoscyamus schwankt der Alkaloidgehalt bedeutend, in frischen Blättern sind im Mittel 0,15, in frischen Samen 0,3—0,5 % enthalten, die Droge soll 0,07% Hyoscyamin führen; Caesar und Loretz fanden 1912: 0,043—0,072 %.

Nach Kuntz (Bot. Centralbl. 1924, IV, S. 343) steigt der Alkaloidgehalt der Blätter und Wurzeln annähernd parallel, später steigt er in den Wurzeln und nimmt in den Blättern ab. Matsapa findet die Blätter während der Blütezeit am alkaloidreichsten.

In Datura fand Feldhaus im Samen 3,33, in der Hauptwurzel 0,1, in Seitenwurzeln 0,25, Blättern 0,39, Stengel 0,54, Corolle 0,43, reifen Samen 0,48, im Keimling 0,67 % Gesamtalkaloid. Bei Kulturpflanzen war (Mitlacher und Wasicky) der Gehalt der Blätter auf gedüngtem Boden 0,342, ungedüngt 0,325 %; die reifen Samen enthielten ungedüngt 0,279, gedüngt 0,283 %, die unreifen 0,299 und bei gedüngtem Boden 0,309 %. Chevalier hatte zuvor einen höheren

---

[1]) G. Klein u. H. Sonnleitner, Der Nachweis der „Solanaceenalkaloide“, Österr. bot. Zeitschr., 1929, LXXVIII, S. 9.

[2]) E. Baur, Studien über die Bedeutung der Alkaloide in pharmakognostisch wichtigen Solanaceen, besonders in Atropa belladonna und Datura stramonium, Diss. Bern, 1919.

Gehalt durch Düngung mit mineralischem Stickstoffdünger, Nitrat und Stallmist, erhalten. Die individuellen Unterschiede sind gering, D. stramonium 0,46—0,55, D. tatula 0,47—0,63 % (Miller und Maeder, 1912).

B. Pater, Pharmazeut. Monatsh. 4, 63 (1923), fand in weißen unreifen Samen 0,34 % Alkaloid und 22 % fettes Öl, in braunen noch unreifen Samen 0,3 % Alkaloid und 23 % Öl, in schwarzen reifen Samen 0,3 % Alkaloid. Junge Keimpflänzchen enthielten 0,27 % und 0,13 % Alkaloid.

Bei der Samenreife[1]) nimmt der prozentische Alkaloidgehalt der Trockensubstanz zunächst zu, dann wieder ein wenig ab. Den höchsten Alkaloidgehalt *haben die Samen, die ihre volle Größe erreicht haben, aber noch weiß oder hellbraun* gefärbt sind. Der absolute Alkaloidgehalt ist in den reifen Samen am größten.

Die Keimlinge enthalten in der Trockensubstanz prozentisch mehr Alkaloid als die Ausgangssamen, gleichgiltig ob sie im Licht (Länge 5 cm) oder im Dunkeln (Länge 10—12 cm) gekeimt sind. Der absolute Alkaloidgehalt nimmt bei der Keimung ab. Die Samenschalen enthalten auch nach der Keimung ein wenig Alkaloid.

Samen, bei denen man die allein die Alkaloide enthaltende Samenschale entfernt hat, keimen ebensogut, wie normale Samen und liefern alkaloidreiche Keimpflanzen (Clautriau).

Solaneen sind geeignete Objekte zum Studium über die Wanderung der Alkaloide bei Pfropfungen (Linsbauer u. Grafe, A. Meyer u. E. Schmidt, M. Javillier). Sichergestellt ist die Wanderung der Basen über weitere Strecken. Die Wanderung erfolgt im Leitparenchym.

Zum mikrochemischen Nachweis der Alkaloide (ohne Ermittlung der Lokalisation) in pflanzlichem Material benutzten Klein und Sonnleitner außer Reaktionen von Schnitten die Mikrosublimation (im Klein-Wernerschen Apparat) und die Extraktion mit Chloroform + Ammoniak im Kleinschen Mikroextraktionsapparat.

Zur Identifizierung von Atropin, Hyoscyamin und Scopolamin erwies sich Jodwasserstoffsäure (spez. Gewicht 1,7) als bestes Reagens. Mit Atropin bilden sich mehr- (vielfach sechs-)eckige Täfelchen, Rauten und zum Teil eingekerbte Prismen, die vom tiefsten Schwarz bis zum leuchtenden Rot gefärbt sind und oft lebhaft irisieren; bei Hyoscyamin entstehen vielfach Dreiecke, Scopolamin liefert vorwiegend rechteckige Formen, in Pflanzenextrakten Doppelpinsel und Kombinationen von solchen. Als sicherer erwiesen sich in diesen Fällen die Reaktionen mit Goldchlorid (5proz.) allein oder mit einem Zusatz von 10 % Kaliumbromid. Letzteres gibt zunächst eine rotbraune amorphe Fällung, aus der sich nach kurzer Zeit Kristallfiedern bilden. Sie gehen bei längerem

[1]) J. Feldhaus, Quantitative Untersuchung über die Verteilung des Alkaloides in den Organen von Datura Stramonium L., Arch. d. Pharmazie, 1905, CCXXXXIII, S. 328.

Stehen im dunstgesättigten Raum zum Teil in sechseckige Formen und lange prismatische Kristalle über. Mit Goldchlorid allein treten blaß hellgelbe Formen auf.

Tunmann[1]) empfahl die Reaktion des Atropins mit Chlorzinkjod: Es entstehen sofort bräunliche bis dunkelrote oder schwarzrote Kristalle, meist Rauten. Besonders charakteristisch sind die aus 4 Rauten bestehenden Kristallkreuze. Die Kristalle leuchten bei gekreuzten Nikols nur wenig auf und lassen keinen Pleochroismus erkennen.

Hyoscyamin gibt mit Chlorzinkjod 4-, 5- und 6-eckige Plättchen mit unregelmäßigem Umriß; bei Gegenwart von größeren Mengen von Hyoscyamin, ebenso beim Umkristallisieren durch Erwärmen entstehen Drusen.

Atropin gibt in ein wenig verdünnter Salzsäure gelöst mit alizarinsulfosaurem Natrium Körnchen, die bald in halbkugelige, aus gebogenen, manchmal verzweigten Federn bestehende Gebilde übergehen, Scopolamin gibt eine amorphe Fällung, ebenso Hyoscyamin[2]).

Zur Ermittlung der Lokalisation hat sich Jodjodkalium (brauner Niederschlag, bisweilen sternförmige Kristalle von metallischem Aussehen) bewährt, das, seit es de Wèvre[3]) zuerst benutzte, allen späteren Autoren diente. Auch Anema[4]) ging mit Jodjodkalium vor und in neuerer Zeit benutzte es Troegele[5]) bei Atropa „ausschließlich". de Wèvre wandte noch Phosphormolybdänsäure an (gelber Niederschlag) und Clautriau[6]) außerdem noch Kaliumquecksilberjodid (weiße, schwer sichtbare Fällung) während Molle[7]) noch heranzog Pikrinsäure, Tannin, Platinchlorid und Goldchlorid (starke, gelbe Fällung). Diese Reagentien bewährten sich ebenfalls bei Scopolia japonica. Barth[8])

[1]) O. Tunmann, Über mikrochemische Alkaloidfällungen mit Chlorzinkjodlösung, Apoth.-Ztg., 1917, XXXII, S. 76.

[2]) L. Rosenthaler, Alizarinsulfosaures Natrium als Reagens auf Alkaloide, Apoth.-Ztg., 1930, XLV, Nr. 41.

[3]) A. de Wèvre, Localisation de l'atropine, Bull. Soc. belge de Microsc., 1887, XIV, S. 19—22.

[4]) P. Anema, Sitz der Alkaloide in narkotischen Pflanzen, Neederl. Tijdschr. voor Pharm., 1892, S. 212.

[5]) F. Troegele, Über das Verhalten der Alkaloide in den Organen der Atropa Belladonna L., Würzburger Diss., 1910.

[6]) G. Clautriau, Localisation et signification des alcaloides dans quelques graines, Bull. de la Soc. belge de Microsc., 1894, XVIII, S. 35.

[7]) Ph. Molle, Rech. de microchimie comparée sur la localisation des alcaloides dans les Solanacées, Bull. Soc. belge de Microsc., 1895, XXI, S. 8 und: Mém. de l'Acad. royale de Belg., 1895, LIII.

[8]) H. Barth, Studien über den mikrochemischen Nachweis von Alkaloiden, Dissertation, Zürich, 1898, S. 25.

empfiehlt Joddämpfe (braune Fällung), Bromdämpfe (gelbe Fällung), Bromwasser (kleine Kriställchen neben gelben amorphen Klumpen) und Siim Jensen[1]) hält am geeignetsten (bei Hyoscyamus): Jodjodkalium, Kaliumwismutjodid, Joddämpfe, Bromwasser und Brombromkalium. Letzteres Reagens (S. 432) wird hier zum ersten Male zum mikrochemischen Alkaloidnachweis herangezogen und ist empfindlicher als Bromwasser (Fig. 128). Da die Fällungen (ausgen. mit Jod) oft erst nach Stunden entstehen und in dieser Zeit die Reagenslösungen zum Teil verdunsten, umzieht Molle die Deckgläser mit Wachs. Barth hat die mit Goldchlorid oder mit Kaliumquecksilberchlorid behandelten Präparate ausgewaschen und in Schwefelwasserstoffwasser gebracht

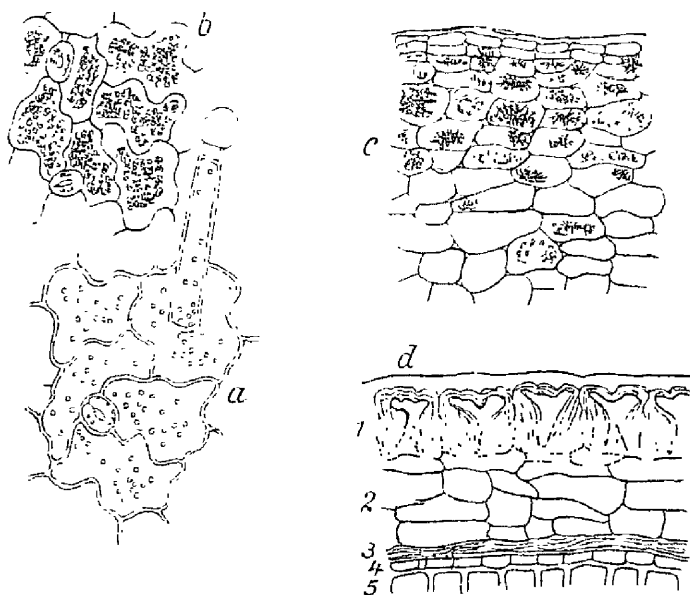



Fig. 128. Atropa belladonna, Fällungen mit Brombromkalium; *a* und *b* obere Blattepidermis, *a*) bei Beginn der Einwirkung und *b*) nach einiger Zeit; *c*) Wurzel, äußeres Parenchym. *d*) Datura stramonium, nicht ganz reifer Samen, Schicht 3 führt Alkaloide (Tunmann)

(Schwarzfärbung der Alkaloidzellen). Die Präparate (besonders der Samen) dürfen vorher nicht in Wasser gelegen haben.

Von Baur wurde die von Wasicky zum makrochemischen Nachweis empfohlene Dimethylamidobenzaldehyd-Schwefelsäure mikrochemisch verwendet. Man bringt das Präparat auf eine dünne Schicht des Reagens und erwärmt vosichtig seitwärts vom Schnitte mit kleinstem Flämmchen. Bei wasserarmen Geweben (Samen) tritt die Reaktion sehr bald ein. Bei wasserreichen muß man einige Zeit warten, dabei aber stets wieder unter dem Mikroskop beobachten. Sobald die Reaktion an einer Stelle eintritt, muß das Erwärmen sofort unterbrochen werden.

[1]) Siim Jensen, Beiträge zur botanischen und pharmakognostischen Kenntnis von Hyoscyamus niger, Dissertation, Marburg, 1900, Bibl. botanica, 1901, Heft LI.

Die Schnitte sollen vom Reagens gut durchfeuchtet sein, ohne daß der ganze Raum unter dem Deckglas von dem Reagens erfüllt ist.

Niethammer (l. c. S. 507, 1) verwendet zum Nachweis im Gewebe Reineckes Salz.

Über mikrochemische Reaktionen auf Atropin siehe noch M. Wagenaar, Pharmac. Weekbl. 1928, LXV, S. 367, auf Hyoscyamin derselbe, ebenda, S. 549, auf Scopolamin derselbe, ebenda, S. 1226; Referate in Mikrochemie 1929, VII, S. 367ff.

Über die Lokalisation der Alkaloide in den drei wichtigsten in diese Gruppe gehörenden Pflanzen Atropa belladonna L., Datura stramonium L. und Hyoscyamus niger L. ist folgendes bekannt:

Atropa belladonna.

Wurzel: In der jungen Wurzel sitzt das Alkaloid nur in den äußersten Zellreihen und einigen Zellen des Rindenparenchyms. Mit dem Funktionieren des Kambiums findet man es auch im sekundären Holzparenchym. Nach Molle enthält auch die Wurzelhaube Alkaloid.

Stengel: Der Vegetationspunkt gibt nur eine schwache Reaktion. Im jungen Stengel findet man Alkaloid in Rinde und Mark, im älteren vorzugsweise in der Epidermis und den darunter gelegenen Schichten, in dem dem äußeren Siebteil benachbarten Rindenparenchym und dem an den inneren Siebteil angrenzenden Markparenchym. Dagegen geben Klein und Sonnleitner an, daß sie in Rinde, Holz und Mark des „Stammes" kein Alkaloid finden konnten. Es hängt dies wohl vom Alter der Pflanze ab, die im Herbst an Alkaloid verarmt!

Blatt: Nach Baur ist der Hauptsitz der Alkaloide (nach Klein und Sonnleitner Hyoscyamin mit Spuren von Atropin) zu jeder Zeit das Schwammparenchym, dann folgt das Palisadengewebe und schließlich bei jungen Blättern und Sonnenblättern die Epidermis. Die Nerven sind reicher an Alkaloid. Alkaloidhaltig sind auch die Köpfchen der Drüsenhaare (Rosenthaler und Mosimann).

Im Blattstiel ist die Lokalisation ungefähr dieselbe wie im Stengel. Die Alkaloide der vegetativen Teile, nicht der Wurzel, sind nach Rosenthaler und Mosimann von Tannid begleitet.

Blüte: In Kelch- und Blumenblättern soll die Verteilung dieselbe sein, wie im Laubblatt. In den Staubgefäßen findet man Alkaloid in den Epidermiszellen, in der Endodermis des kleinen Gefäßbündels, in der Epidermis des Staubbeutels und der Nährschicht des Pollens (Molle). Die Fruchtblätter enthalten ebenfalls Alkaloid, der Griffel besonders in der Nähe der Gefäßbündel, die ovula geben Alkaloidniederschläge in den äußeren Schichten.

Im Blütenstiel soll das Mark am gehaltreichsten sein. Der Pollen ist alkaloidfrei (Trögele).

Samen: Nach der Untersuchung von Grogg scheint Alkaloid (nach Klein und Sonnleitner mehr Atropin wie Hyoscyamin) in der Nährschicht aufzutreten. Es ist wahrscheinlich, daß die Verhältnisse dieselben sind, wie in dem besser untersuchten Samen von Datura stramonium (s. unten).

Datura stramonium. Wurzel und Stengel, Samenkapsel und Samen enthalten nach Klein und Sonnleitner nur Hyoscyamin, Blatt und Fruchtstiel daneben wenig Scopolamin.

Wurzel: In der jungen Wurzel in Kork, Phelloderm und ein wenig in der Rinde.

Stengel: Im subepidermalen Collenchym, im Rindenparenchym, in den „Stereiden" (Molle) und im Siebteil. Die zwei unteren Zellen der Deckhaare sollen ebenfalls Alkaloid enthalten.

Blatt: In den Epidermen, besonders der oberen, in der Umgebung und im Innern des Gefäßbündels und (schwach) im Mesophyll.

Blüte: Ähnlich wie bei Atropa.

Ovulum und Samen. Nach Goris enthält bereits die Nährschicht des jugendlichen Samens reichlich Alkaloid, das auch nach der Obliterierung darin verbleibt.

Die Samenschale ist nach Baur alkaloidfrei, der Keimling enthält etwa die Hälfte des gesamten Alkaloids des ganzen Samens.

Im Blatt von Datura stramonium wiesen Rosenthaler und Mosimann Tannid neben Alkaloid nach in dem Endköpfchen der Drüsenhaare und in den Schließzellen der Spaltöffnungen.

Über die Alkaloide der Gattungen Duboisia, Mandragora und Scopolia sei auf die ausführliche Arbeit von Klein und Sonnleitner verwiesen.

Hyoscyamus niger. Nach Klein und Sonnleitner hat die Hauptwurzel in der Rinde wenig Atropin und Tropin, in Spuren Hyoscyamin; das Holz enthielt kein Alkaloid, das Mark wenig Tropin und Spuren von Atropin. In den Nebenwurzeln wenig Atropin, sehr wenig Tropin. Stengel und Blatt sollen nur Spuren von Alkaloid (Hyoscyamin) enthalten. Die Blüte führt neben wenig Tropin und Spuren von Hyoscyamin Scopolamin. Im Fruchtkelch Scopolamin und Tropin, in der Samenkapsel außer Scopolamin und Tropin Spuren von Hyoscyamin. Im Samen neben Hyoscyamin ziemlich viel Scopolamin.

Die Lokalisation ist wohl im wesentlichen dieselbe wie bei den beiden anderen.

In den jungen Blättern findet sich Alkaloid in allen Parenchymzellen, aber vorzugsweise in den Epidermen und den Zellen in der Umgebung der Nerven, auch in den Köpfchen der Drüsenhaare.

In den Schließzellen der Epidermis und den Köpfchen der Drüsenhaare findet sich neben Alkaloid Tannid (Rosenthaler und Mosimann).

Auch hier findet Grogg, daß im reifen Samen das Alkaloid in der obliterierten Nährschicht lokalisiert ist und daß auch im Endosperm geringe Mengen vorkommen.

In den vegetativen Teilen von Hyoscyamus niger verfolgte Siim Jensen sehr eingehend die Alkaloide; sie finden sich im Fruchtknoten in beiden Epidermen der Fruchtknotenwand, weniger im Parenchym und in den Placenten; im Kelche sind die den Siebsträngen anliegenden Parenchymzellen alkaloidhaltig, in der Kronenröhre das die Gefäße umgebende Parenchym. Im Blatte fanden sich Alkaloide im Phloemparenchym, im jungen Blatte, das alkaloidreicher ist, auch im Mesophyll, nie aber, im Gegensatz zu Molle, in der Epidermis. Die sekundär verdickte Achse führt Alkaloid: in der Epidermis, in der primären Rinde, im Parenchym der Rindenstränge, in den an das Mark grenzenden Siebsträngen, im Mark und in den Markstrahlen von Rinde und Holz. In der Wurzel wurden sie nachgewiesen: in der Korkschicht, im Phellogen, im Phelloderm, im Phloemparenchym und in den Markstrahlen der Rinde.

Zu weiteren Studien wäre Hyoscyamus muticus zu empfehlen, die im Mittel 0,75 %, fast ausschließlich Hyoscyamin enthält, in den Blättern sogar 1,34, im Samen bis 1,17 %.

Lewinsky[1]) untersuchte Wurzeln und Rhizome mit den allgemeinen Alkaloidreagentien, in erster Linie Jodjodkalium.

Scopolia carniolica. Analoge Verhältnisse, wie sie Molle bei Scopolia japonica fand. Sowohl im Rhizom wie in der Wurzel ist die Rinde am alkaloidreichsten. Unbedeutende Zunahme der Alkaloidmenge in blühenden Pflanzen gegenüber jüngeren.

Scopolia lurida Dun. Auch hier sitzt Alkaloid beim jungen Rhizom in fast allen Gewebeschichten. Stärkere Fällungen in den inneren Korklagen und dem angrenzenden Rindenparenchym. In der Gefäßzone nur vereinzelte Fällungen; wenig in der inneren Rinde und dem Mark.

Die jüngere Wurzel enthält in der Epidermis und den Schichten, die unterhalb davon liegen, Alkaloid. In älteren Stadien lokalisieren sie sich außerdem in dem zwischen den Xylemstrahlen verlaufenden Parenchymgewebe, sowie im Mark.

---

[1]) E. Lewinsky, Vergleichende Anatomie der Wurzeln und Rhizome einiger pharmakognostisch wichtiger Solanaceen. Lokalisation und Bestimmung der Alkaloide, Botan. Archiv, 1924, VI, S. 313.

Scopolia physaloides Dun. Im jüngeren Rhizom ist Alkaloid hauptsächlich in der Epidermis und der Rinde, aber auch im übrigen Gewebe, am wenigsten in der unmittelbar an die Gefäße grenzenden Zone.

Wurzel: Hauptsitz die Epidermis, die angrenzenden Rindenschichten und das Mark. Die Holzzone ist fast ganz frei. Bei der Wurzel der blühenden Pflanze sind die Fällungen relativ reichlicher und treten auch im Parenchym des Holzes auf.

Mandragora vernalis Bertol.

Rhizom: Bei jüngeren Pflanzen nicht sehr viel Alkaloid in der Epidermis und den Korkschichten, mehr in der Rinde und im Siebteil, wenig in der Gefäßbündelzone und wieder mehr im Mark. Fruktifizierende Pflanzen geben stärkere Reaktionen in den Korkschichten.

Wurzel: In den jüngeren Vegetationsperioden enthält die Rinde den größten Anteil an Alkaloiden, in Epidermis und Kork ist wenig, im übrigen Gewebe fast nichts. In späteren Stadien wie im Rhizome.

Physalis alkekengi L.

In Rhizom und Wurzeln geringe Niederschläge in der Epidermis, in Rinde und Mark.

Datura stramonium L.

In der Wurzel deutliche Fällungen nur im Kork und in den unmittelbar darunter gelegenen Rindenschichten.

Hyoscyamus niger L.

In den jüngeren Wurzeln einjähriger Pflanzen reichliche Fällungen im Kork und in der Epidermis, desgleichen in der Rinde. Die Zone um die Gefäßbündel herum enthält keine Alkaloide.

Bestätigt für Belladonna die Resultate von Molle, für Solanum dulcamara die von Molle und Schaarschmidt.

Der Hauptsitz der Alkaloide in den behandelten Wurzeln sind die Epidermis und die subepidermalen Schichten der Rinde.

Capsicum

Das scharf schmeckende Prinzip von Capsicum annuum und C. fastigiatum ist das Alkaloid Capsaicin. Farblose Täfelchen. F. 64,5°. Wenig in Wasser löslich, leicht in Weingeist, Äther, Chloroform, Benzol. Mit Wasserdämpfen ein wenig flüchtig. Löslich in Ätzalkalien. Ein Tropfen der Lösung 1 : 100 000 schmeckt noch scharf brennend. Mit Trioxymethylen-Schwefelsäure (0,02/5 ccm) gibt es eine beständige violette Färbung (Wasicky u. Klein).

Die Lokalisation des Capsaicins wurde von A. Meyer[1]) aufgeklärt, von Molisch weiter verfolgt. Gruppen von Epidermiszellen der Scheide-

[1]) A. Meyer, Pharm. Ztg., 1889, XXXIV, S. 130 und Wissenschaftl. Drogenkunde II, S. 418.

wände strecken sich und werden zu Sezernierungszellen; dann verdickt sich die Außenmembran, die Kutikula wird abgehoben und in dem subkutikularen Raum sammelt sich das capsaicinhaltige Sekret in Tröpfchen an. Das Sekret wird durch Kupferazetatlösung grün gefärbt[1]). Zusatz von Kalilauge löst das Sekret, und momentan scheiden sich aus der Lösung zahlreiche 4—6seitige Täfelchen von Capsaicinkalium (Fig. 129) aus[2]). Von dem scharfen Geschmack des Capsaicins kann man sich leicht überzeugen, wenn man eine Spur des Sekretes mit der Nadel herauspräpariert und auf die Zunge bringt. Die Grundsubstanz des Sekretes ist ein fettes Öl, wie Pabst[3]) makrochemisch ermittelte und später Nestler[4]) an den Myelinbildungen feststellen konnte (S. 257). Durch Einreißen der Drüsenkutikula gelangt das capsaicinhaltige Sekret, besonders bei getrockneten Früchten, auch auf andere Gewebe der Früchte[5]).

Fig. 129. Drüsenfleck von Capsicum annuum, Capsaicinkalium (mit Kalilauge) (Tunmann)

Nikotiana

In den Nikotiana-Arten finden sich mehrere Alkaloide. Hauptalkaloid ist das Nikotin. Farbloses sich an der Luft leicht bräunendes Öl. Kp. 240—242°. Flüchtig.

Durch Züchtung lassen sich sowohl nikotinfreie Tabakpflanzen erzielen, als solche, die 12 % Nikotin enthalten.

Der Gesamtgehalt an Alkaloid ist in den einzelnen Arten recht verschieden (von 0,3 bis 9 %). In der Basis und in der Mitte der Achse sind annähernd gleiche Mengen, die Spitze ist alkaloidärmer (Basis 0,129, Mitte 0,132, Spitze 0,074 %). (R. Gaze, Apoth.-Ztg., 1911, XXVI, S. 938.) Im Gegensatz zu Errera, der Nikotin als Schutzmittel gegen Tiere auffaßt, stellt de Toni fest, daß sich viele Tiere von Nikotiana ernähren.

[1]) O. Tunmann, Dissert. 1900, S. 10.

[2]) H. Molisch, Histochemie, Jena 1891, S. 54.

[3]) Th. Pabst, Zur chemischen Kenntnis der Früchte von Capsicum annuum, Arch. d. Pharm., 1892, CCXXX, S. 108.

[4]) A. Nestler, Zur Kenntnis der Fructus Capsici, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm., 1906, Nr. 11.

[5]) So sagt die Literatur. Da aber Capsaicin sehr leicht flüchtig ist, so ist nach Ansicht von Tunmann ein Transport dieses Körpers durch intakte Drüsen und kutikularisierte Membranen an sekundäre Lagerstätten sehr leicht möglich (wie beim Kampfer oder Alantolakton u. a.). Derart würden sich auch die Angaben von Istvanffy (Justs Bot. Jahresber., 1891, I, S. 65) und Guillard (Les piments des Solanées Thèse Paris, 1901) erklären lassen, nach denen Capsaicin auch im Collenchym der Scheidewände und im Samen auftreten soll.

„Nikotin wird in wachsenden Pflanzen oder Pflanzenteilen unter sonst normalen Bedingungen gebildet, selbst dann, wenn eine Stickstoffzufuhr von außen und damit eine primäre Eiweißsynthese verhindert wird und die Plasmabildung in neu entstehenden Zellen auf Kosten des Reserveeiweißes vor sich geht. Ausgewachsene isolierte Blätter vermehren ihren Alkaloidgehalt nicht. Die Nikotinbildung scheint in einem engen Verhältnis zum Wachstum zu stehen.“ Irgendeine nachweisbare bedeutsame Translokation des Alkaloides findet nicht statt. Von den jüngsten zu den ältesten Blättern nimmt der Alkaloidgehalt zu (Mothes[1]). Auch Baggesgaard Rasmussen[2]) findet ein regelmäßiges Ansteigen des Nikotingehaltes vom Juni bis zum Oktober.

Das Nikotin tritt in den Keimlingen im ersten Keimungsstadium auf. Man erhält in Pflänzchen von 1 mm Länge mit Bouchardats Reagens innerhalb der Aleuronkörner einen Niederschlag. In einem 5 mm langen Pflänzchen tritt die Reaktion in den von den Aleuronkörnern herrührenden Vakuolen auf, die sich dann zu einer großen vereinigen. Auch in den Basalzellen der mehrzelligen Epidermishaare tritt die Reaktion in den Vakuolen auf.

In den Pflänzchen von 3 mm Länge befindet sich das Nikotin ein wenig über dem Vegetationspunkt der Wurzel in der äußersten Rindenschicht (assise pilifère) in den Wurzelhaaren (poils absorbants) und in geringer Menge in den Keimblättern.

In den Pflänzchen von 5—10 mm Länge ist das Nikotin noch an denselben Orten; die Kotyledonen sind daran ärmer mit Ausnahme der Epidermis, wo die Niederschläge sehr dicht eintreten.

Chaze[3]) hat (im heißen Juli 1928) beobachtet, daß Nikotin (aus der Epidermis, besonders der oberen) in Form feiner Tröpfchen nach außen austritt, ebenso aus den Haaren.

Von Morgens bis Abends nimmt der Gehalt an Alkaloiden (berechnet auf 100 qcm Blattoberfläche) zu, von Abends bis Morgens ab, letzteres auch wenn die Blätter längs des Mittelnerven eingeschnitten und die Achse oberhalb und unterhalb der Blätter geringelt ist. Es findet also — mindestens in der Nacht — ein Verbrauch von Alkaloiden statt (Rosenthaler[4]). Nach Theron und Cuttler[5]) steigt der Gehalt an Nikotin bis zur Blütezeit, und nimmt während der Samenbildung ab. Sie halten das Nikotin für ein Aufspeicherungsprodukt, das im Bedarfsfall wieder verbraucht wird.

[1]) K. Mothes, Pflanzenphysiologische Untersuchungen über die Alkaloide I. Das Nikotin im Stoffwechsel der Tabakpflanze. Planta, 1928, V, S. 563.

[2]) H. B. Rasmussen, Beiträge zur Kenntnis der Alkaloidbildung in den Pflanzen. Orientierende Untersuchungen über den Protein- und Nikotingehalt der Tabakspflanze während des Wachstums. Biochem. Zeitschr., 1915, LXIX, S. 461.

[3]) J. Chaze, Sur l'apparition et la localisation de la nicotine dans la plantule du tabac, Compt. rend. Acad. sciences, 1927, CLXXXV, S. 80.

[4]) L. Rosenthaler, Zur Biochemie des Tabaks, Apoth.-Ztg., 1929, XXXIV, Nr. 92.

[5]) Chem. Centralbl., 1925, II, S. 729.

Tunmann[1]) empfahl zum Nachweis des Nikotins eine Lösung einiger Kriställchen von p-Dimethylaminobenzaldehyd in rauchender Salzsäure, womit Nikotin eine rosa, zuletzt violettrote Färbung gibt und Pikrinsalzsäure (kalt gesättigte Pikrinsäurelösung + 10 % Salzsäure). Mit letzterer erhält man einen kristallinischen Niederschlag. Die prismatischen Kristalle leuchten bei gekreuzten Nikols in Gelb und Grün und haben vorwiegend schiefe Auslöschung.

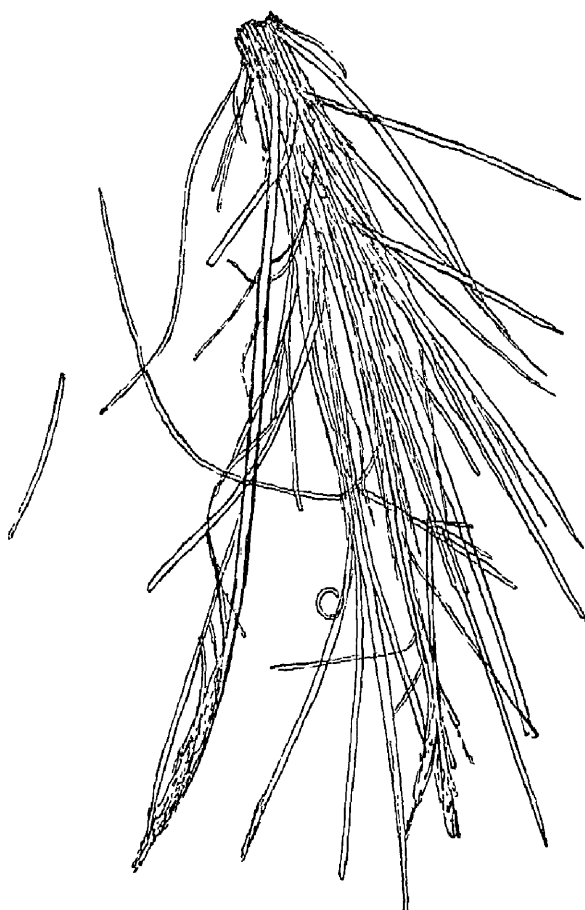



Fig. 130. Dinitro-α-Naphthol-Verbindung des Nikotins (Steiner)

Klein u. Herndlhofer[2]) bevorzugen zum Nachweis des Nikotins Goldchlorid-Natriumbromid. Es entstehen geschweift deltoidische lichtbraune Kristalle, die sich bei größerem Nikotingehalt zu Bäumchen aneinandergliedern. Erfassungsgrenze 0,2 γ. Empfindlichkeitsgrenze 1 : 400 000. Sie konnten damit in 0,5 g Samen noch Nikotin nachweisen, indem sie das Nikotin in einem Mikrodestillationsapparat destillierten. Nikotin ist nach den genannten Forschern im Tabak in allen Organen und allen Altersstadien vorhanden. Im Blatt ist die größte Menge, nicht viel weniger in der Wurzel.

Steiner[3]) verwendet zum Nachweis des Nikotins das Dinitro-α- Naphthol. Die Nikotinverbindung bildet fein hellorangegelbe, meistens gebogene Nadeln mit gewöhnlich spitzer, häufig undeutlicher Endung (Fig. 130). F. 52°. Unter dem Polarisationsmikroskop zeigt sie mittelstarken Dichroismus (axial hellorangegelb, basal hellbraungelb), bei gekreuzten Nikols Interferenzfarben höherer Ordnung und gerade Auslöschung.

---

[1]) O. Tunmann, Zum Nachweis des Nikotins, Apoth.-Ztg., 1918, XXXIII, S. 485.

[2]) G. Klein u. E. Herndlhofer, Der histochemische Nachweis des Nikotins, Österr. bot. Zeitschr., 1927, LXXVI, S. 222.

[3]) M. Steiner, Weitere Untersuchungen über flüchtige Stickstoffbasen bei höheren Pflanzen, Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1929, XVII, S. 247.

Zum Nachweis des Nikotins im Gewebe können folgende Reagentien dienen: Jodquecksilberjodkalium (weißgelbliche Fällung), Phosphormolybdänsäure (gelbliche Fällung), Quecksilberchlorid (weißer, in überschüssigem Chlorammonium in der Wärme leicht löslicher Niederschlag), Platinchlorid (gelbliche Fällung), Jodjodkalium (erst braune Färbung, dann rotbrauner Niederschlag, der sich beim Erwärmen sofort auflöst, bei gewöhnlicher Temperatur langsam verschwindet). Diese schon von Maistriau[1]) bei Nicotiana macrophylla benutzten Reagentien haben sich bewährt (Molle). Anema[2]) bestimmte den Sitz der Alkaloide mit Jodjodkalium und de Toni[3]) gebrauchte außerdem noch Tanninlösung, Jodsäure-Jodjodkalium und Kaliumwismutjodid. Schärfere Reaktionen erhielt Tunmann bei vorherigem Eintragen dickerer Schnitte lebender Pflanzen in heißen Alkohol (½—1 Minute). Die Lokalisation leidet hierbei nur wenig (?)

Die Angaben über die Lokalisation lauten übereinstimmend. Die Befunde Maistriaus wurden bestätigt. Reich an Alkaloiden sind die Vegetationsspitzen, junge Achsen und junge Blättchen (Maistriau). Die Alkaloide sind in folgender Weise lokalisiert: in der Wurzel: im Hypoderm und in 4—5 Reihen der Außenrinde; im Stengel: in der Epidermis und in Trichomen (besonders in den Basalzellen derselben), ferner im Mark, Rindenparenchym und in den Markstrahlen; im Blatt: in der Epidermis (wenig), im Mesophyll (reichlich), Nervenparenchym; im Blattstiel in der Umgebung der Bündel; im Blütenstiel im Collenchym; im Kelch der noch nicht geöffneten Blüte und in der noch grünen Blumenkrone in der Epidermis und in einigen Parenchymzellen; in der geöffneten Blüte sind die Kronenblätter, soweit sie gefärbt sind, d. h. nicht vom grünen Kelch bedeckt werden, alkaloidfrei (Anema). Schließlich sind Alkaloide ermittelt in Epidermis und Parenchym der Staubfäden, in der Epidermis der Stempel und Fruchtblätter, in der Epidermis der Placenta.

Rosenthaler und Mosimann erhielten bei den Blättern von Nicotiana tabacum und rustica mit Brombromkalium + Salzsäure und Silikowolframsäure dichte körnige Niederschläge in den Schließzellen der Spaltöffnungen, den Nebenzellen und den Endzellen der Köpfchenhaare. In denselben Zellen kommt auch Tannid vor.

[1]) Maistriau in Prem. recherch. s. l. localis. et significat. des alcaloides, Bruxelles, 1887, S. 13 des Sep.

[2]) P. Anema, Sitz d. Alkaloide in narkot. Pflanzen, Neederl. Tijdschr. voor Pharm., 1892, S. 212.

[3]) G. B. de Toni, Ricerche istochimice preliminari sulla pianta del Tabacco. Localizzazione della nicotina, Atti del R. Ist. Veneto di scienze, 1893, IV, S. 1736.

Weitere Solaneen wurden von Molle untersucht. Bei Nicandra physaloides waren Phosphormolybdänsäure, Kaliumquecksilberjodid, Tannin ohne Erfolg, während Jodjodkalium einen braunen, bläulich schimmernden, Goldchlorid einen schmutzigbraunen, Pikrinsäure einen braunen Niederschlag erzeugte. Bei Physalis Alkekengi bewährten sich Jodjodkalium (gelbbrauner, bald farblos werdender Niederschlag), sowie Goldchlorid (hellgelbe Fällung) und Phosphormolybdänsäure (gelbbrauner Niederschlag). Die Alkaloide von Petunia violacea lassen sich mit Jodjodkalium, Phosphormolybdänsäure, Pikrinsäure und Goldchlorid nachweisen, wobei bräunliche Niederschläge entstehen, die jedoch bald verschwinden. Bei Salpiglossis sinuata lassen sich Jodjodkalium, Goldchlorid, Kaliumquecksilberjodid verwenden; es entstehen bräunliche Niederschläge, doch sind nur die mit Jodjodkalium erzeugten, bläulich schimmernden bleibend. Die Alkaloide in Brunfelsia americana gaben mit Kaliumquecksilberjodid einen braunen, bläulich schimmernden, mit Phosphormolybdänsäure und Goldchlorid gelbliche Niederschläge.

Die Untersuchungen Molles bei diesen Pflanzen führten zu folgendem Resultat: In ausgewachsenen Teilen sind die Alkaloide beschränkt auf Epidermis und die die Gefäßbündel umgebenden Schichten; im Blatt auf Epidermis und Phloem, in der Wurzel auf Rindenparenchym und Peridermelemente. Blüte, Samenknospe und Karpelle enthalten ebenfalls häufig Alkaloide, doch verschwinden sie bei der Reife ganz oder teilweise; auch Endosperm und Embryo reifer Samen sind alkaloidfrei.

Solanin

Das Glykoalkaloid Solanin (1820 Desfosses) stellt farblose Nadeln dar, die bei ca. 250—260° schmelzen. Fast unlöslich in Wasser, schwer löslich in kaltem, leichter in heißem Weingeist, unlöslich in Äther und Chloroform. Löst rote Blutkörperchen auf. Hydrolyse ergibt Solanidin, Glykose, Galaktose und Rhamnose. Solanin und ähnliche Glykoalkaloide sind in der Gattung Solanum weit verbreitet.

Der Solaningehalt normaler Kartoffeln schwankt zwischen 2 und 10 mg %, die äußeren Schichten enthalten mehr als die inneren. Belichtung geernteter Kartoffeln erhöht den Solaningehalt (Bömer u. Mattis). In manchen Jahren (so 1922) kann der Solaningehalt den normalen weit übersteigen (bis 0,08 %). Solaninreiche Kartoffeln können beim Anbau wieder normale liefern. Düngung mit Kalium erhöht den Solaningehalt (Sabalitschka u. Jungermann). Beim Auskeimen der Kartoffeln findet bei Zutritt des Lichts Vermehrung statt[1]); in einem Keimling von 1 cm Länge wurde 0,5 % Solanin gefunden. Bei der Keimung von Solanin-Samen fand Albo eine starke Zunahme von Solanin.

---

[1]) G. Albo, Sulla funzione fisiologica della Solanina, Contrib. alla Biol. veg. Palermo, 1899, II, S. 185.

Zur Lokalisationsermittelung gebrauchte Schaarschmidt[1]) Salpetersäure (die aber unbrauchbar ist, da reines Solanin keine oder doch nur eine schlechte Farbenreaktion damit gibt) und Schwefelsäure. Letztere färbt solaninhaltige Zellen hellgelb, rötlich, violettrot, grünlich, dann verblaßt die Färbung. Auch Theorin[2]), nach dem Solanin im Knollen von Solanum tuberosum entsteht und von dort in die jungen Triebe und in die Früchte gelangt, bediente sich der Schwefelsäure. Die Schnitte gelangen direkt in die Säure. Schaarschmidt gibt für S. tuberosum, nigrum, dulcamara, Capsicum annuum, Lycopersicum esculentum, Mandragora officinalis Solanin an in der Wurzel (subepidermal), Fruchtschale (zerstreute Parenchymzellen), Stengel (subepidermales Kollenchym) und im Blatt (Nerven, nicht Mesophyll, nur bei Lycopersicum sind die „äußersten Zellen des Schwammparenchyms" solaninhaltig).

Wothtschall[3]) untersuchte verschiedene Solanum- und 3 Scopolia-Arten und benutzt Selenschwefelsäure (0,3 g selensaures Natrium, 8 ccm Wasser, 6 ccm konzentrierte Schwefelsäure), die noch mit 0,00003 g Solanin deutliche Reaktionen gibt. Die Präparate werden in Selenschwefelsäure ganz schwach erwärmt. Die Solaninzellen werden himbeerrot, dann johannisbeerrot, gelblich und schließlich farblos[4]). Die gleichen Reaktionen erhält man, wenn man das selensaure Natrium durch Tellursäure ersetzt (Bauer, Ztschr. ang. Chem., 1899, S. 99). Vanadinschwefelsäure (frisch bereitet aus 0,1 Teil vanadinsaurem Ammonium und 100 Teilen eines Gemisches von 9,8 Teilen konzentrierter Schwefelsäure und 3,6 Teilen Wasser), mit der sich noch 0,01 mg Solanin nachweisen lassen, bewirkt zunächst orangegelbe Färbung, die in Rot und zuletzt in Blauviolett übergeht. Fette Öle, die bei den Methoden (bei Gegenwart von Zucker und Eiweiß) ebenfalls in Reaktion treten können, entfernt Wothtschall durch kurzes Eintauchen der Präparate in Äther (10—15 Minuten). In den ausgewachsenen Organen ist der Solaningehalt in der Rinde am größten. Die arzneilich benutzten Stengel von S. dul-

[1]) J. Schaarschmidt, Über die mikrochem. Reaktion des Solanins, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, S. 61.

[2]) P. G. Theorin, Einige pflanzenmikrochemische Notizen, Sv. Vet. Ak. Stockholm, 1885, Nr. V, S. 29.

[3]) E. Wothtschall, Über die mikrochemischen Reaktionen des Solanin, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1889, V, S. 19, und Pharm. Journ. and Transact., 1890, S. 50.

[4]) Nach Fischer u. Thiele ist Selen-Schwefelsäure ein Reagens auf Solanidin und reagiert mit Solanin erst beim Erwärmen. Erhält man bei Abwesenheit von Anthocyan in einem Schnitt durch Zusatz von Selenschwefelsäure ohne Erwärmen eine Rotfärbung, so ist Solanidin vorhanden.

camara (Stipites) gaben in der Rinde deutliche, im Mark schwache, im Gefäßbündelring keine Reaktion. Solanin fand Tunmann nur im Zellsaft. Wothtschall hat es auch in der Membran angetroffen. Wahrscheinlich war dieses bei getrocknetem Material der Fall. Bei mit Äther behandelten Präparaten geben allerdings die Membranen Solaninreaktion, da der Äther, der das Fett entfernen soll, Spuren von Solanin in die Zellwände überführt. In den Solaninzellen tritt gleichzeitig Gerbstoff auf, wodurch die Farbenreaktionen abgeändert werden (Molle). Niethammer zog zum Nachweis des Solanins die „tiefe Rotfärbung" mit Reineckes Salz heran (von mir nicht beobachtet).

Die angeführten Reaktionen sind zum mikrochemischen Nachweis nur mit Vorsicht zu benützen. Sie können nur dann als beweisend gelten, wenn aus den betreffenden Objekten Solanin oder Solanidin mit Sicherheit makrochemisch isoliert wurde und Anthocyan, das schon mit verdünnter Schwefelsäure eine Rotfärbung gibt, fehlt. Auf Grund mikrochemischer Reaktionen allein darf eine Pflanze nicht für solaninhaltig erklärt werden, denn bei der alkaloidreichen Familie der Solanaceen können andere (noch unbekannte) Alkaloide ähnliche Reaktionen bedingen.

Kommt es nicht auf die Ermittelung der Lokalisation, sondern nur auf die Feststellung des Solanins an, dann stellt man sich etwas Solanin dar. Man zieht die fein zerkleinerten Objekte mit weinsäurehaltigem Wasser aus, filtriert, neutralisiert das Filtrat mit gebrannter Magnesia, dampft zur Trockne, nimmt den Rückstand mit heißem Alkohol auf und filtriert sofort ab. Gelatinieren des Filtrates zeigt größere Solaninmengen an. Mit diesem alkoholischen Auszug lassen sich nun die Reaktionen ausführen. Missaghi[1]) dampft einige Tropfen Solaninlösung mit verdünnter Platinchloridlösung bei 60—70° im Uhrglase ein, worauf rote bis violette Färbung erfolgt.

Die meisten Solanin-Zellen führen gleichzeitig den basischen Spaltling des Solanins, das Solanidin, (s. S. 537, Anmkg. 4), welches in Äther und Chloroform unlöslich ist und mit Kaliumquecksilberjodid, Jodjodkalium, Pikrinsäure (gelbe, in Essigsäure unlösliche Fällung) und Goldchlorid Reaktionen gibt (Molle, Lit., S. 526, 7).

Fischer[2]) wendet teils allein, teils mit J. Thiele, sein Blutgelatine-Verfahren zum Nachweis des Solanins an. Dabei ist für Solanin — im Gegensatz zu einem Saponin — charakteristisch, daß die Hämolyse von $p_h = 10$ nach $p_h = 6{,}1$ abfällt.

Solanum tuberosum: Blatt schwach hämolytisch, Vanadin-Schwefelsäure negativ. Stamm: Rinde schwach, Holz und Mark nicht

---

[1]) G. Missaghi, Ber. Deutsch chem. Ges., 1876, IX, S. 83.

[2]) R. Fischer u. J. Thiele, Über den Solaninnachweis in der Kartoffel mit Blutgelatine, Österr. bot. Zeitschr., 1929, LXXVIII, S. 325.

hämolysierend. Vanadinreaktion positiv. Unreife Frucht: äußerer Teil der Fruchtschale unter dem Perikarp stärker hämolytisch als die übrige Frucht. Vanadinreaktion hier ebenfalls positiv. Same: Nährgewebe schwach hämolytisch, Vanadinreaktion negativ.

Solanin findet sich in der Knolle in der Hauptsache in den ersten zehn auf das — solaninfreie — Periderm folgenden Zellschichten des Speichergewebes. In den Schößlingen findet sich das Solanin im ganzen Querschnitt, in der Rinde ungefähr achtmal soviel wie im Mark. Die Bildung findet an den Stellen intensivsten Stoffwechsels statt; es entsteht aus dem primär gebildeten Solanidin. In den Schößlingen ist Solanidin präformiert vorhanden.

Solanum nigrum: Blattepidermis und Mesophyll hämolysieren schwach. Stengel: Rinde schwach. Blüte: Antheren nichts. Korolle am Grunde bei der Ausmündung der Gefäßbündel; Fruchtknoten und Blütenboden stark. Unreife Frucht: Fruchtfleisch und Same stark. Reife Frucht: Perikarp nicht, Same schwach. Wurzel: Rinde stark, Holz schwächer, Mark nichts.

Solanum dulcamara: Blattepidermis nichts; Mesophyll schwach, nur in der Nähe der Gefäßbündel stärker. Stengel: nur in der Rinde. Unreife Frucht: Perikarp und Same stark. Reife Frucht: nicht.

Solanum lycopersicum: Blattepidermis und Mesophyll hämolysieren schwach; Vanadin-Schwefelsäure negativ. Stengel: überall, am schwächsten im Mark. Unreife Frucht und Same schwach, keine Solaninreaktion. Reife Frucht: kaum erkennbare Hämolyse. Wurzel: Rinde stark, Holz schwach.

Apocynaceae

Kickxiin

In der Rinde von Kickxia arborea Steud. fand Boorsma[1]) geringe Mengen eines Alkaloids, dagegen scheint der giftige Bestandteil des Milchsaftes ein Toxalbumin zu sein.

Pool hat folgende Beobachtungen gemacht:

Werden Fragmente des Blattes mit verdünnter Natronlauge erhitzt, so entsteht eine dunkelbraunrote Flüssigkeit und die Milchsaftzellen werden braun.

Querschnitte durch den Hauptnerv werden durch starke Salpetersäure rotbraun, durch starke Salzsäure hellgrün. Schnitte durch junge Stengel werden mit Froehdes Reagens braunviolett, Schnitte durch den Samen mit konzentrierter Schwefelsäure violett, mit konzentrierter Salpetersäure gelb.

Boorsma, Mededeel. s'lands plantentuin, 1899, XXXI, 46, 133.

Alkaloid von Rauwolfia serpentina Benth. (Ophioxylon serpentinum L.)

J. F. Eykman[1]) entdeckte in der Wurzelrinde ein Alkaloid, das dann von Greshoff auch in der Zweigrinde angetroffen wurde.

Wird ein Wurzelstückchen mit starker Salpetersäure befeuchtet, dann färbt sich die Rinde dunkelrot. Junge Wurzeln sind reicher an Alkaloid als alte. Im Holzteil findet sich auch ein wenig Alkaloid. In der Zweigrinde tritt mit Salpetersäure nur Orangefärbung ein; sie enthält demnach viel weniger Alkaloid als die Wurzelrinde.

Alkaloide von Kopsia flavida Bl.

Greshoff[2]) fand Alkaloide in Blatt, Samen und Rinde; van den Driessen-Mareeuw[3]) gibt u. a. folgende Reaktionen der aus der Rinde isolierten Alkaloide an. Mit konzentrierter Schwefelsäure schwache Gelbfärbung, die durch Erwärmen in Violett übergeht. Mit Dichromat-Schwefelsäure nach 5 Minuten purpurviolette Färbung. Mit Schwefelsäure + Ceroxyd Violettfärbung. Mit rauchender Salpetersäure braunrote, in Purpurviolett übergehende Färbung, die mit einem Tropfen Wasser grün wird. Die beiden ersten Reaktionen erhielt van Giffen[4]) auch mit Schnitten durch den Samen; bei der Mikrosublimation erhielt er zum Schlusse Tropfen, aus denen sich sofort oder nach einigen Stunden Kristalle abschieden. Das Sublimat wurde mit konzentrierter Salpetersäure orangerot bis pfirsichrot.

Scrophulariaceae

In der Epidermis von Linaria striata erhielt Dufour[5]) mit Jodjodkalium einen braunen, fein kristallinischen Niederschlag; nähere Angaben fehlen.

Rubiaceae

Cinchona

Pelletier und Caventou fanden 1820 Chinin und Cinchonin in der Chinarinde, gegenwärtig kennt man in den Cinchona-Arten einige 20 Basen der Chinolin-

[1]) J. Eykman, Een bezoek aan's lands plantentuin te Buitenzorg, 1887. — Greshoff, Schetsen van nuttige Indische planten.

[2]) Greshoff, Mededeelingen uit's lands plantentuin te Buitenzorg, 1890, VII.

[3]) van den Driessen-Mareeuw, Ned. Tijdschr. voor Pharm. Chem. en Tox, 1896, S. 199.

[4]) van Giffen, H. J., Eenige gegevens ter opsporing van giftige Indische plantendeelen, Utrecht 1917; Pool J. F. A., Bijdrage tot de kennis van den anatomischen bouw van de belangrijkste in Nederlandsch-Oost. Indie vorkommende vergiftige Apocynaceae usw., Pharmac. Weekbl., 1928, LXV, S. 905ff.

[5]) J. Dufour, Notices microchimiques sur le tissu épidermique des végétaux, Bull. Soc. vaud. d. Sc. nat., 1886, 3. sér., XXII, S. 134.

gruppe, die meist gut kristallisieren. Neben diesen kristallisierbaren Basen kommen auch amorphe Basen, vorzugsweise in den Blättern und in jüngeren Zweigen, vor.

Die Alkaloide sind in allen Teilen der Cinchonen enthalten, in Spuren in den Organen der Blüten, auch im Pollen, in den Kotyledonen der Keimpflanze, im zentralen Gewebe der Knospenschuppen, in den Blättern (hypodermales Gewebe, Palisaden, Schwamm- und Nervenparenchym, Lotsy). Das Holz der Bäume ist arm an Alkaloid (bis 0,5 %). In der Rinde sind die Bastfasern (C. Müller), die Siebröhren (Lotsy) und die Sekretzellen (Charpentier) alkaloidfrei. Die Rindenalkaloide sind ausschließlich im Parenchym des Phloems und der Außenrinde (de Vrijs u. a.), besonders reichlich im Wundparenchym lokalisiert. In den Zellen sind die Basen vermutlich an Chinasäure und Chinagerbsäure gebunden und entstehen immer in nachstehender Reihenfolge: amorphes Alkaloid, Cinchonin, Cinchonidin, Chinin, Chinidin.

Der Prozentgehalt der Chinarinde an Alkaloid ist bekanntlich abhängig von der Art der Bastardierung, von Kultur, Klima, Boden u. a. de Vrijs vermutete, Lotsy suchte zu beweisen, daß die Basen in den Blättern entstehen und von dort in den Stamm abwandern. Die Rindenalkaloide sollten also nur Umsetzungsprodukte der Blattbasen sein. Nach van Leersum (Ak. v. Wet., Amsterdam, 1910, S. 116) findet ein Abwanderung nicht statt (Ringelungsversuche), die Blattbasen stehen mit der Assimilation in keinem Zusammenhang, sie sind nur Abbauprodukte.

Die vier Hauptalkaloide sind Chinin, Chinidin, Cinchonin, Cinchonidin.

Chinin. Wasserfrei lange Nadeln. F. 174,6°. Schwer löslich in Wasser, leicht in Weingeist, Äther, Chloroform, weniger in Benzol, schlecht in Petroläther. Ist im Vakuum leicht zu sublimieren, schwerer bei gewöhnlichem Druck. Das empfindlichste Reagens auf Chinin ist nach Klein und Schilhab[1]) das Trinitroresorzin. Ein Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit wird mit dem Reagens versetzt, kurz aufgekocht und in die feuchte Kammer gestellt. Beim Abkühlen entsteht ein schwerer pulveriger Niederschlag, der sich nach einiger Zeit zu großen gelben sternförmigen Nadelbüscheln umsetzt. In verdünnteren Lösungen entstehen Kristalle mit pinselartigem Fortsatz an den Enden. Auch das Chromat und das Jodsulfat (Herapathit) sind brauchbare Abscheidungsformen.

Cinchonin. Monokline Nadeln oder Prismen, die schon unter 200° zu sublimieren beginnen. F. 250° (unter teilweiser Zersetzung). Ist in Wasser, Weingeist, Chloroform, Äther schwerer löslich als Chinin.

Sehr empfindliche mikrochemische Reagentien sind nach Klein und Schilhab Trinitrobenzol, Kaliumchromat, Platinbromid und Platinjodid.

Chinidin. Blättchen (aus Wasser) monokline Prismen (aus Alkohol) Rhomboeder (aus Äther). Leicht löslich in Chloroform, gut auch in Weingeist und Äther, schwer in Petroläther. Sublimierbar.

Brauchbar zur Unterscheidung von Chinin sind die Fällungen mit Kaliumjodid (Kombination eines rhombischen Prismas mit einer hemiedrisch ausgebildeten

[1]) G. Klein u. A. Schilhab, Nachweis der Cinchona-Alkaloide, Österr. bot. Zeitschr., 1928, LXXVII, S. 251.

Pyramide) und Trioxybenzoesäure (Gallussäure ?). Aus feinen Nadeln zusammengesetzte Scheibchen.

Cinchonidin. Prismen oder Blättchen F. 206,5°. Schwer löslich in Wasser und absolutem Äther, leichter in Weingeist, leicht in Chloroform. Sublimierbar. Klein u. Schilhab verwenden zum Nachweis u. a. Seignettesalz und Platinbromid.

Über den Nachweis der Cinchonaalkoide im Gemische siehe die Veröffentlichung von Klein u. Schilhab.

Über mikrochemische Reaktionen der vier Haupt-Cinchona-Alkaloide siehe M. Wagenaar, Pharmac. Weekbl. 1929, LXVI, S. 177, 197, 250, 261; Referate in Mikrochemie 1929, VII, S. 374ff.

Bei der Untersuchung wird es sich meist um den Nachweis der Alkaloide in Schnitten der Droge handeln, da die Beschaffung lebenden Materials schwierig ist. Außerdem kann der Nachweis in Auszügen (Behrens) erbracht werden.

Die Ermittelung der Lokalisation der Basen in der Droge beansprucht geschichtliches Interesse. Von verschiedener Seite werden Prioritätsansprüche erhoben. Eine eingehende Darstellung erscheint hier angebracht.

Wohl die erste Untersuchung rührt von Oudemans[1]) her, der Schnitte (der Droge von C. calisaya u. rubra) in mit Ammoniakgas gesättigten Alkohol legte und nach dem Verdunsten des Reagens vierseitige, zugespitzte und abgerundete Pyramiden erzielte, die sich schnell in Äther lösten. Howard[2]) benutzte später konz. Kalilauge, in der er dünne Schnitte einen Augenblick erwärmte, worauf die Lauge sofort entfernt wurde. Howards Annahme, daß die Alkaloide in ähnlicher Kristallform zuweilen freiwillig im Parenchym auskristallisieren, wurde von verschiedenen Autoren widerlegt und Flückiger konnte ausgeschiedene Alkaloidkristalle an der ihm von Howard überlassenen Rinde nicht auffinden. Schacht[3]) und Wigand[4]) hatten die Ansicht vertreten, daß die Basen nur in den Bastzellen lokalisiert wären. Wigand färbte Schnitte mit Cochenille und da die Bastfasern sich im Gegensatz zu Lein- und Hanffasern stark färbten, so sollten die Alkaloide in der Membran der Bastfasern ihren Sitz haben. Wurde anderseits die Rinde mit heißem Wasser ausgezogen, im Auszuge der Gerbstoff mit Eisenchlorid gefällt und mit dem Filtrat, das als Alkaloidlösung angesprochen wird, Lein- oder Hanffaser imprägniert, so wu de von diesen jetzt Cochenille gespeichert. Die extrahierten Chinafasern färbten sich nicht. Nur kurze Zeit konnte sich diese

---

[1]) C. A. J. A. Oudemans, Aanteekeningen der Pharmakopoea neerlandica, Rotterdam 1855, S. 221.

[2]) J. E. Howard, Quinology of the East Indian Plantations, 1869, S. 33.

[3]) H. Schacht, Anatomie u. Physiologie der Gewächse, Berlin 1856, I, S. 400.

[4]) A. Wigand, Welches der Hauptzellenelemente ist als Sitz der Alkaloide anzusehen? Bot. Ztg., 1862, I, S. 137.

Ansicht behaupten; sie wurde von Carl Müller[1]) auf makrochemischem Wege widerlegt. Rindenspäne wurden durch Schütteln mit „Eisendrahtspiralen“ und „reinem grobkörnigen Flußsand“ zerkleinert, so daß die Parenchymzellen zertrümmert, die Bastfasern aber unversehrt blieben. Das Pulver kam in eine Glasretorte, die mit einem Blasebalg in Verbindung stand und über eine eingeschaltete zweite Retorte in ein mit Wasser gefülltes Gefäß führte. Nun wurde Luft eingeblasen und so wurden die feineren Parenchymfetzen in die Vorlage übergetrieben, während die Bastfasern zurückblieben. Die getrennten Massen wurden mit verdünnter Schwefelsäure erschöpft und aus den Auszügen die Basen amorph abgeschieden. Parenchym fast 10 %, Bastfasern 2 % Alkaloid. Der geringe Gehalt der Fasern wird durch die den Fasern anhängenden Reste von Parenchym bedingt. Diese Ergebnisse konnte Flückiger[2]) bestätigen, der ebenfalls Fasern und Parenchym trennte und zur Charakteristik die Elemente trocken im Reagenzglase erhitzte. (Auftreten rotvioletter Dämpfe zeigt Alkaloid an, Grahesche Reaktion). Schließlich fand Carles[3]) die Fasern alkaloidfrei.

Auf makrochemischem Wege war die Lokalisation sichergestellt. Zum mikrochemischen Nachweis bediente man sich allgemein der Kalilauge (sie wurde auch von Vogl[4]) vielfach benutzt), doch war man mit ihrer Hilfe noch nicht auf die Lokalisation eingegangen. Erst Parfenow[5]) beschäftigte sich hiermit eingehend und fand die Basen nur im Inhalte des Parenchyms und der Saftröhren. Kurze Referate dieser Dissertation brachten C. Müller (Justs Jahrber., 1887) und Tschirch (Bot. Ztg., 1885, S. 52). Letzterer beschäftigte sich bald darauf selbst mit der Lokalisation (Tagebl. 60. Naturforsch.-Ver., Wiesbaden) und untersucht hauptsächlich das Wundparenchym; er sagt: „Ich habe auch festgestellt, daß die Chinaalkaloide vornehmlich im Phloemparenchym vorkommen (was übrigens nur die Angaben Flückigers, N. J. C. Müllers und Carles' bestätigte, resp. präzisierte) und daß auch das Wund-Rindenparenchym besonders alkaloidreich ist[6]).“

Aus der besprochenen Literatur geht hervor, daß Carl Müller (nicht N. J. C. Müller und nicht Flückiger) als erster makrochemisch den Sitz der Basen ins Parenchym verlegt, Parfenow[7]) mikrochemisch mit Hilfe der Kalilauge.

Sonderbarerweise wird ganz allgemein zum Nachweis in der Droge (Chinarinden) die Howardsche Methode mit mehr oder weniger ver-

[1]) Carl Müller, Untersuchungen über den Sitz der Alkaloide in der Cinchonarinde, Jahrb. f. wiss. Bot., 1866, V, S. 238.

[2]) F. A. Flückiger, Beiträge zur Anatomie der Chinarinden, Schweiz. Wochenschr. f. Chem. u. Pharmaz., 1866, IV, S. 361.

[3]) Carles, Journ. de Pharm. et de Chim., 1873, XVI, S. 22.

[4]) A. Vogl, Chinarinden 1867, Beitr. z. Pflanzenanatomie, 1869.

[5]) Ilfa Parfenow, Chemisch-pharmakognostische Untersuchung der braunen amerik. Chinarinden aus der Sammlung d. pharm. Inst. Dorpat, Dissertat., 1885.

[6]) A. Tschirch, Angewandte Pflanzenanatomie, 1889, S. 130.

[7]) Vgl. C. Müller, Justs Jahrb., 1887, II, S. 565.

Kalilauge

22

ratur
at. Atlas,
werden Schnitt
schlägt die Farbe in
zellen und über diese

lden sich in den Parenchym-
Schnitte, große dunkle Tropfen,
0—12 Stunden sind

ormen, ...
...ielt man auf einfachere Weise
Einlegen der Schnitte in ein Gemisch von Glyzerin und Kalilauge

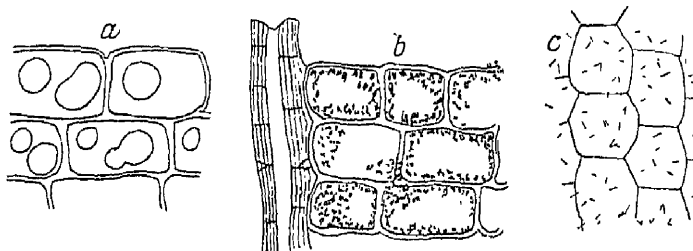



Fig. 131. Cinchona calisaya (Rinde, Droge); Alkaloidfällungen
a) mit Kalilauge, b) Brom-bromkalium, c) Kaliumferrocyanid

(A. Meyer). Die Kristallisation (Sphärokristalle) erfordert jedoch längere Zeit. Karbonatausscheidungen werden durch Verkitten des Deckglases verhindert.

Bei der Reaktion mit alkoholischem Ammoniak (Oudemans), die stets Kristalle liefert, sind gleichzeitige Fällungen von Pflanzensäuren nicht ausgeschlossen. Am brauchbarsten erscheint neben Jodjodkalium in erster Linie Brombromkalium, wenn man dünne Längsschnitte, die sich aus der Rinde sehr leicht herstellen lassen, verwendet (Fig. 131b). Mit Säuredämpfen schlugen die Reaktionen fehl (Salzsäure färbt die Bastfasern violett). Kaliumdichromat gibt nur amorphe Klumpen. Hingegen erhält man stets und sofort sehr feine Kriställchen, die im polarisierten Licht silbergrau aufleuchten, wenn man die Schnitte in Kaliumferrocyanid legt und nach einigen Augenblicken etwas verdünnte Salzsäure zusetzt (Fig. 131c). Die Kristalle sind aber überwiegend nicht im Präparate. Die meisten Reaktionen werden durch die Phlobaphene beeinträchtigt.

Rosenthaler und Mosimann verwendeten mit gutem Erfolg Silikowolframsäure + Salzsäure. Man kann mit diesem Reagens noch

Vanillin kombinieren und dadurch nachweisen, daß die Alkaloide und ein mit Vanillin-Salzsäure eine Rotfärbung gebendes Tannid in denselben Zellen vorkommen.

Die Milchsaftröhren der Rinde haben wir in Übereinstimmung mit anderen Beobachtern frei von Alkaloiden gefunden.

Man kann mit 1 mg eines normalen Chinarindenpulvers die Cinchonabasen in folgender Weise demonstrieren[1]): Man erwärmt mit einigen Tropfen einer Auflösung von 2 g Ätznatron in 100 g 50proz. Weingeist auf dem Objektträger, nachdem man mit einem Deckglas überdeckt hat. Den verdunsteten Weingeist ersetzt man durch Wasser. Nach dem Abkühlen sieht man zahlreiche Kristalle: Stäbchen, die teils ver-

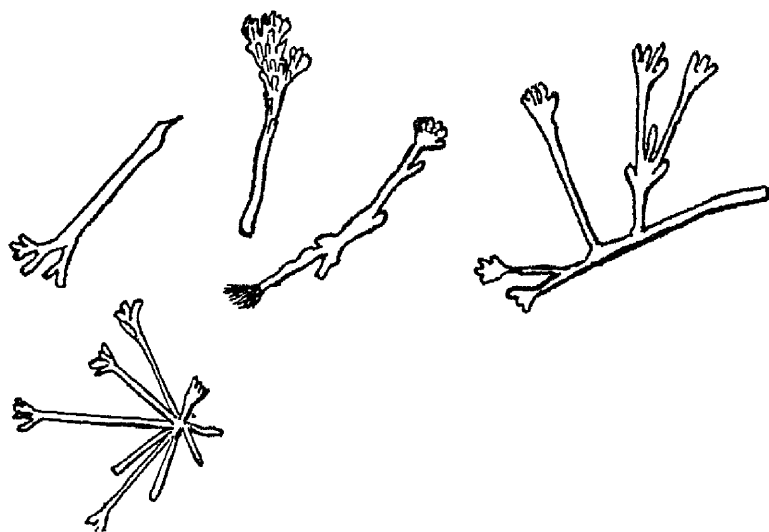



Fig. 132. Cinchona-Alkaloide aus Chinarinde mit weingeistig-wässriger Natronlauge (gez. Großglauser)

einzelt liegen, teils gekreuzt sind oder Büschel, Pinsel und Doppelpinsel bilden (Fig. 132).

Über den Nachweis von Alkaloiden durch Extraktion von 0,05 g bis 0,1 g Droge siehe die Veröffentlichung von Klein und Schilhab.

Zum Nachweis der Alkaloide in gepulverter Chinarinde verwendete A. Niethammer Reineckes Salz (s. S. 433).

In den Auszügen wies Behrens[2]) die Basen nach. Seine Methode wurde von van Leersum[3]) verbessert und einfacher gestaltet. 0,001 g mit Ammoniak durchfeuchtetes Rindenpulver wird mit 2 ccm warmem Benzol oder Chloroform extrahiert; der Auszug wird zur Trockne ge-

[1]) L. Rosenthaler, Chemische Charakterisierung von Drogen, Schweiz. Apothek.-Ztg., 1924, LXII, S. 121.

[2]) H. Behrens, Anleitung z. mikr. Analyse, III. Heft, S. 101.

[3]) P. van Leersum, Mitteilungen über mikrochemische Untersuchungen, Mededeel. v. d. Lab. d. Gouv. Kina ond., Batavia, 1905.

bracht, der Rückstand in Essigsäure aufgenommen. In dem Verdampfungsrückstand dieser Lösung wird Chinin mit Natriumtartarat, Kaliumoxalat oder Kaliumchromat nachgewiesen. Außerdem kann nach erfolgter Kristallisation die Mutterlauge entfernt und das Chinin als Herapathit bestimmt werden[1]). Die Reaktionen gelingen stets, falls der Chiningehalt relativ hoch ist. Sind größere Mengen von Cinchonidin anwesend, so müssen diese zuvor entfernt werden.

Die Herstellung der Auszüge kann umgangen werden durch Sublimation. Wir sublimieren etwas angefeuchtetes Pulver auf der Asbestplatte und benutzen eine 5 cm hohe Flamme, deren Spitze die Asbestplatte berührt. Alle Minuten wird ein neuer Objektträger aufgelegt, nach 6 Minuten ist die Sublimation beendet. An einigen der Sublimate bemerken wir einen starken rötlichen Schein, vorzüglich die Kanten der Objektträger sind gerötet (Grahesche Reaktion). Die anderen Beschläge zeigen erst nach 15—20 Stunden Kristallbildung (Fig. 70, S. 318), geben die allgemeinen Alkaloidreaktionen, mit verdünnter Schwefelsäure eine blau fluoreszierende Lösung und können nach Behrens und van Leersum weiter geprüft werden.

Bei lebendem Material empfahl Lotsy[2]) zum Nachweis in der Zelle ebenfalls Jodjodkalium als bequemstes und doch sicheres Reagens. Herder (s. S. 46 der auf S. 463, angeführten Dissertation) gebrauchte, in 30proz. wässeriger Chloralhydratlösung gelöst, Caesiumquecksilberjodid (Empfindlichkeitsgrenze für Chinin 1 : 20 000, für Cinchonin 1 : 10 000) und Baryumquecksilberjodid (Chinin 1 : 25 000, Cinchonin 1 : 12 000). Die Niederschläge treten bei lebendem Material deutlich hervor, doch besitzen die kleinen Kriställchen keine charakteristischen Formen. Lotsys Angaben über die Lokalisation wurden bestätigt.

Über die Lokalisation der Alkaloide außerhalb der Droge (Rinde) seien folgende Angaben gemacht[3]):

[1]) Eine Lösung von Chininsulfat in Essigsäure gibt nach dem Aufkochen mit einer mit Schwefelsäure angesäuerten, gesättigten alkoholischen Jodlösung stark polarisierende Kristalle von schwefelsaurem Jodchinin (Herapathit). Nach Behrens und Emich kann die Reaktion am Objektträger ausgeführt werden. Man mischt aus Wasser, Alkohol und einer Spur Schwefelsäure einen langen Tropfen, bringt in das eine Ende etwas Jod, in das andere die Substanz und läßt den Objektträger 5—20 Minuten unter einer Glocke liegen.

[2]) P. Lotsy, De localisatie van het Alcaloid in Cinchona Calisaya en in C. succirubra, Mededeel. van de Laboratoria des Gouvernements Kina onderneming, No. I, Batavia 1898.

[3]) Lotsy, De localisatie van het alcaloïd in Cinchona Calisaya, Ledgeriana und succirubra, Meded. van d. Laborat. der Gouvernementskinaonderneming, Batavia 1898. — A. Goris u. M. N. Reimers, Recherches microchimiques sur les quin-

Wurzel: Im primären Stadium ist nur wenig Alkaloid vorhanden, besonders in einigen Zellen des Rindenparenchyms in der Nähe der Endodermis; im sekundären findet man es im Siebparenchym, im Phelloderm und manchmal auch in den jungen Korkzellen.

Stengel: Im Rindenparenchym, Pericykel, in den Markstrahlen, im Mark und dem Parenchym der Sieb- und Gefäßteile, manchmal auch im ruhenden Kambium, nicht in dem in Teilung begriffenen.

Blatt: Die Epidermis des erwachsenen oder wenig entwickelten Blattes enthält keine Alkaloide.

Dagegen finden sie sich reichlich in der subepidermalen chlorophyllfreien Schicht; sie fehlen bei Cinchona Ledgeriana Moens und C. succirubra Pavon im Mesophyll des jungen Blattes. Wenn aber die noch gelblichen Blätter die Knospe verlassen, bilden sich Alkaloide und schließlich enthalten alle grünen Blätter Alkaloide vor allem in der Nähe der Gefäßbündel. Im Mittelnerven enthalten die Parenchymzellen, das Kollenchym und das Bastparenchym Alkaloide.

Blattstiel: Am alkaloidreichsten ist die subepidermale Kollenchymschicht; außerdem enthalten Alkaloide: die Zellen des Rindenparenchyms, des Pericykels, des Bastparenchyms und des Marks.

Blüte: Die sehr junge Blüte enthält keine Alkaloide; später finden sie sich in Kelch und Korolle im Mesophyll und besonders in der subepidermalen Schicht.

In den Staubgefäßen findet man sie zuerst im Konnektiv, später in den drei Schichten, die die Wände der jungen Antheren bilden. In den ausgewachsenen Antheren findet man sie nur noch in der Epidermis.

Die Kotyledonen enthalten eine große Menge von Alkaloid.

Pausinystalia Yohimbe

In Blättern und Rinde von Pausinystalia Yohimbe kommen mehrere Alkaloide vor. Hauptalkaloid ist das Yohimbin. Nadeln F. 234—234,5°. Sehr schwer in Wasser löslich, leicht in Weingeist u. dgl., auch in Benzol. Mit p-Dimethylaminobenzaldehyd-Schwefelsäure grünbraun, dann braun. Durch gute Kristallisierbarkeit ist das Hydrochlorid ausgezeichnet. Mit den üblichen mikrochemischen Reagentien habe ich nur amorphe Fällungen erhalten.

Zieht man ein wenig Rinde auf dem Objektträger mit ammoniakalischem Chloroform aus und befeuchtet nach dem Verdunsten des Chloroforms den am Rande entstandenen Rückstand mit p-Dimethylaminobenzaldehyd-Schwefelsäure, so entsteht sofort eine tiefbraune Zone.

quinas, Bull. sciences pharmacol., 1901, III, S. 284. — J. B. Charpentier, Etude anatomique et microchimique des quinquinas de culture, Thèse doct. Un. Pharm., Paris, 1900.

Yohimbin wies Griebel[1]) nach, indem er den alkalischen Auszug des Rindenpulvers mit Äther ausschüttelte und mit dem Rückstand der Ätherausschüttelung die Reaktionen vornahm. Konzentrierte Schwefelsäure löst farblos, bei Zusatz eines Körnchen Kaliumdichromat fließen blauviolette Streifen ab, die bald blaugrau, schließlich grünbraun werden. Erdmanns Reagens färbt dunkelblau, gelbgrün, Froehdes Reagens dunkelblau, bleibend grün, Vanadinschwefelsäure dunkelblau, grün. Im Gewebe verfolgte Tunmann (Verh. Naturf.-Ges. Karlsruhe 1911, II 1, S. 313) die Basen. Bei dem getrockneten Rindenmaterial, welches zur Verfügung stand, war es zweckmäßig, die Schnitte zuvor mit Wasser einige Minuten auszuwaschen. Ein Teil des, die Reaktionen verdeckenden, Gerbstoffes wird derart entfernt. Erdmanns Reagens (mit Chloralhydrat, S. 434) färbt blaugrün, Vanadin- und Molybdänschwefelsäure färben blau, dann dunkelgrün. Die Färbungen treten klar hervor, wenn die Schnitte direkt in die Lösungen eingetragen werden, besonders bei Benutzung von Lampenlicht (ohne Einschaltung der blauen Scheibe). Jodjodkalium kann an dünneren Längsschnitten verwendet werden, der Niederschlag mit Brombromkalium ist sehr gut sichtbar. Die Basen sind nur in den Parenchymzellen und zwar ausschließlich im Zellinhalte lokalisiert. Ein postmortales Eindringen in die Membran findet nicht statt. Ob die Siebröhren Alkaloide führen, kann bei Drogenmaterial schwer entschieden werden. Durch hohen Gehalt zeichnen sich Markstrahlen und äußeres Rindenparenchym aus. Wundparenchym, in dem naturgemäß die alkaloidfreien Bastfasern fehlen, fällt sofort durch hohen Alkaloidgehalt auf. Die Verhältnisse sind bei Corynanthe die gleichen wie bei Cinchona, so daß man durch Erzeugung einer sog. „renewed bark“ eine alkaloidreichere Droge erzielen würde.

Da die Tannidreaktionen (Vanillin-Salzsäure braunrot) in denselben Zellen eintreten, die auch der Sitz der Alkaloide sind (besonders stark in den Markstrahlen), so sind offenbar die Alkaloide mit Tannid verbunden.

Uragoga ipecacuanha (Willdenow) Baillon

Die Ipecacuanha-Wurzel enthält mehrere Alkaloide (Pelletier u. Magendie 1817, Paul u. Cownley u. a.) von denen Emetin, Cephaelin und Psychotrin die wichtigsten sind.

Emetin. Amorphes weißes Pulver. F. 74° (68°). Fast unlöslich in kaltem Wasser, kaum löslich in kaltem Benzin oder Petroläther, leicht in Äther usw.

Cephaelin. Weiße Nadeln (aus Äther). F. 107—108°, Sphärokristalle (aus Ligroin). F. 99—102°. In Äther nur leicht löslich, wenn frisch gefällt, leicht löslich in Chloroform u. dgl., auch in Alkalien löslich.

---

[1]) C. Griebel, Zur Kenntnis und zum Nachweis der Yohimberinde, Zeitschr. f. Nahr.- u. Genußm., 1909, XVII, S. 74.

Psychotrin. Fast farblose Prismen und Doppelpyramiden. In Äther nur reichlich löslich, wenn frisch gefällt. Leicht löslich in Weingeist u. dgl., unlöslich in Ligroin.

Brauchbare mikrochemische charakteristische Reaktionen sind für keines der Alkaloide bekannt.

In der Rio-Wurzel (Uragoga ipecacuanha Baill.) sind gefunden: 1,45 % Emetin, 0,52 % Cephaelin, 0,04 % Psychotrin, in der Cartagena-Wurzel (Urag. acuminata Karsten): 0,89 % Emetin, 1,25 % Cephaelin, 0,06 % Psychotrin.

Zum Nachweis der Alkaloide in Schnitten oder im Pulver können folgende Reaktionen dienen[1]):

1. Man behandelt mit ammoniakalischem Chloroform auf dem Objektträger. Nach dem Verdunsten des Chloroforms setzt man Molybdänsäure-Schwefelsäure und einen Tropfen konzentrierte Salzsäure hinzu. Um das Pulver oder in dessen Nähe entstehen grüne Zonen, neben oder nach denen sich purpurfarbene entwickeln können. Ferner wurde beobachtet, daß nach dem Verschwinden der grünen Zonen zuäußerst gelegene Teilchen sich violett färbten.

2. Verreibt man ein wenig Pulver auf dem Objektträger mit verdünnter Salzsäure und streut darin einige Körnchen Chlorkalk, so umgeben sie sich mit einer orangeroten Zone.

In mikrochemischer Hinsicht liegt zunächst eine Angabe von Tschirch und Oesterle (Anat. Atlas, S. 38) vor; sie sagen: „Da Pikrinsäure und Kaliumbichromat, besonders das letztere, vornehmlich in den innersten Teilen der Rinde (am Kambium) Fällungen hervorrufen, so scheint das Emetin vornehmlich dort seinen Sitz zu haben".

Boelling (S. 21 der auf S. 459 ang. Dissert.) stellte Vorversuche mit den Rohalkaloiden der Ipecacuanha an, die er nach der Vorschrift von Podwissotzki[2]) gewann, und erhielt folgende Reaktionen mit der Wurzel: Jodjodkalium, Chlorzinkjod, Joddämpfe, Kaliumdichromat, Kaliumwismutjodid erzeugen gelbbraune Fällungen im Rindenparenchym, Kambium und Siebteil. Diese Fällungen treten des Stärkegehaltes wegen wenig hervor, ebenso die durch Pikrinsäure, Platinchlorid (dunkelgelb), Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure (weißlich) erzeugten Fällungen. „Die Fällung von Kaliumquecksilberjodid und von Goldchlorid wird durch Nachbehandlung der Schnitte mit Schwefelwasserstoff sichtbar gemacht; die Goldchloridfällung tritt deutlicher hervor nach Reduktion zu metallischem Gold durch Einwirkung der

[1]) L. Rosenthaler, Chemische Charakterisierung von Drogen, Schweiz. Apothek.-Ztg., 1924, LXII, S. 152.

[2]) Podwissotzki, Pharm. Zeitschr. f. Rußland, 1880, Nr. 1 und Arch. f. exp. Path. u. Pharm., XI, S. 231.

Ferrosulfatlösung auf den von der überschüssigen Goldlösung durch Auswaschen befreiten Schnitt." Von Tunmann (Gehe Ber., 1912, S.165) wurden benutzt Natronlauge (Cephaelin), Baryumquecksilberjodid mit nachfolgender Behandlung der Schnitte mit Kaliumdichromat, ferner ein Gemisch von 4 Tropfen Molybdänschwefelsäure und einem kleinen Tropfen rauchender Salzsäure, in welches die Schnitte nach dem Aufhören der Gasentwicklung eingetragen werden (Blaufärbung). Kaliumdichromat (s. oben) ist ohne Wirkung. Im Pulver erhält man Kristalle (sehr feine, gebogene Nadeln) mit angesäuerter Pikrinsäurelösung (5 g konzentrierte, wässerige Pikrinsäurelösung, 20 g Wasser, 0,5 g Salzsäure). Bei der Mikrosublimation von 0,07 g durchfeuchteten Pulvers erhält man bei 5 cm hoher Flamme nach 3—6 Minuten mehrere bräunliche Sublimate, in denen sich farblose bis schwach gelbliche Tropfen finden, welche 1—2 μ große kantige Gebilde führen, sowie über das gesamte Sublimationsfeld verteilt dunkle Körnchen. Die hellgelben Sublimationsballen reagieren mit Jodjodkalium (körniger Niederschlag), mit Ferrichlorid (blaugrün), verdünnter Kalilauge (feine Nadeln), Kaliumwismutjodid (brauner Niederschlag), Goldchlorid (Tropfen und Körner). Läßt man einen kleinen Tropfen Molybdänschwefelsäure vorsichtig auf das Sublimat auffallen (um Strömungen zu vermeiden), so gehen die Einschlüsse der gelben und sich in der Farbe nicht verändernden Sublimationsballen in tiefrote Tropfen über (Cephaelin). Sie lösen sich ferner mit Molybdänschwefelsäure-Salzsäure (s. oben) blaugrün; dadurch unterscheiden sie sich von den dunklen kleinkörnigen Gebilden, die stets unregelmäßig zerstreut sind, nie in den hellen Ballen auftreten und sich mit gelber Farbe lösen (Emetin).

Nach Boelling ist der Sitz des Emetins in primärer Rinde, Kambium und Bastparenchym, nach Tunmann überwiegt Cephaelin im Phellogen und im äußeren Rindenparenchym, Emetin im Kambium und inneren Rindenparenchym. Doch kommen beide Alkaloide in den gleichen Zellen vor, nur nimmt der Emetingehalt nach außen zu ab.

Auch das Holz ist alkaloidhaltig, wenn auch schwächer als die Rinde. In der Rinde geben dieselben Zellen, in denen die Alkaloidreaktionen eintreten, braune Niederschläge mit Uranylazetat. Es ist also ein Tannid vorhanden.

Cucurbitaceae

Citrullus colocynthis

Arbeiten von Power und Moore (Chem. and Druggist, 29. Jan. 1910) haben die Anwesenheit von Alkaloiden im Mark der Früchte von

Citrullus colocynthis erwiesen. Vielleicht kommen die von Braemer[1]) für den Colocynthin-Nachweis angegebenen Reaktionen (s. dieses) diesem Alkaloide zu. Zum Nachweis dienten: konzentrierte Schwefelsäure (blutrot). Froehdes Reagens (grünrot), Mandelins Reagens (blutrot, blauviolett).

Campanulaceae

Lobelia inflata L.

In den oberirdischen Teilen von Lobelia inflata kommen mehrere Alkaloide (Siebert 1891) vor, so das Lobelin, Lobelanin und Lobelanidin (H. Wieland, C. Schöpf und W. Hermsen, 1925).

Lobelin. Farblose Kristalle. F. 128—129°. Gibt mit Natronlauge erhitzt Azetophenon.

In mikrochemischer Richtung sind die Lobelia-Alkaloide nicht bearbeitet.

Fig. 133. Lobelia inflata, nicht ganz reifer Samen, Oberflächenansicht, Alkaloidfällung mit Jodjodkalium (Tunmann)

Bei orientierenden Untersuchungen erwiesen sich konz. Schwefelsäure, Froehdes und Erdmanns Reagens als ungeeignet, besser wirkte Vanadinschwefelsäure (Violettfärbung); am brauchbarsten war Jodjodkalium, welches einen aus kleinen rotbraunen Tröpfchen bestehenden Niederschlag hervorruft, der bald amorph wird und an — Schnitten ausbleibt. Die untersuchten Pflanzen waren (nach makrochemischer Prüfung) im kalten, regnerischen Juli 1912 (bot. Garten Bern) sehr alkaloidarm, so daß in den vegetativen Teilen der Nachweis mit Sicherheit nicht gelang. Hingegen fanden sich relativ reichliche Mengen in den Integumenten und in der sich entwickelnden Samenschale (Fig. 133). Eine kristallinische Fällung (Platinchlorid) war auch im Samen nicht zu erzielen.

Compositae

In einer großen Anzahl Kompositen hat Greshoff[2]) makrochemisch Alkaloide ermittelt. Einige Basen sollen in glykosidischer Bindung auftreten (Achillein, Moschatin, Planta). Mikrochemisch sind die Kompositen sehr dürftig bearbeitet. Verschaffelt[3]) macht einige

[1]) L. Braemer, Sur la localisation des principes actifs dans les Cucurbitacées, Compt. rend., 1893, CXVII, S. 753.

[2]) M. Greshoff, Über das Vorkommen von Alkaloiden in der Familie der Kompositen, Ber. d. pharm. Ges., 1900, X, S. 148.

[3]) E. Verschaffelt in: M. Greshoff, Echinopsine, eene nieuwe kristallijne plantenbasis, Versl. Kon. Akad. v. Wetensch., 1900, S. 688.

Angaben über die Lokalisation des Echinopsins. Lutz[1]) hat einige Arten von Senecio bearbeitet. (S. vulgaris enthält nach Grandval und Lajoux bis 0,05 % Senecionin und Senecin.)

Echinopsin

Rhombische Kristalle mit einem Molekül Kristallwasser F. 152°, leichtlöslich in Chloroform, schwerer in Wasser. Leicht und unzersetzt sublimierbar.

Trinitro-m-Kresol: Blaß-zitronengelbe Kristalldrusen, Nadelbüschel und Nadelprismen mit gerader Auslöschung E. 1 : 40 000. Zum mikrochemischen Nachweis sind außer dem Trinitro-m-Kresolat die Jodreagentien am brauchbarsten. 10proz. Natriumjodid: Lange dünne, schwarze Nadeln mit gerader Auslöschung. Jodwasser (im trockenen Raum): Grauschwarze Nadeln, Nadelbüschel und Stäbchen mit gerader Auslöschung. E. 1 : 300 000. Kaliumwismutjodid: Braune prismatische Kristalle, die bei gekreuzten Nikols Rotfärbung und schiefe Auslöschung zeigen. Kaliumantimonjodid: Braune Nadeln, Prismen und Stäbchen mit gerader Auslöschung. E. im trockenen Raum 1 : 500 000. Jodjodkalium nach Berthaumé (12,7 g Jod, 15 g Kaliumjodid, 100 ccm Wasser): Braune Nadeln und Stäbchen mit gerader Auslöschung. E. im trockenen Raum 1 : 500 000. Natriumgoldjodid: Dunkelbraune Nadeln, Nadelbüschel, Prismen und Sterne. Zwischen gekreuzten Nikols Interferenzfarben und gerade Auslöschung E. 1 : 100 000.

Die zu untersuchenden Pflanzen zogen Klein und Schusta[2]) im Mikroextraktionsapparat mit Weingeist aus. Der weingeistige Auszug wurde verdunstet, der Rückstand in wässeriger Lösung mit Bleiessig-Schwefelwasserstoff gereinigt. Je 0,05 ccm der so erhaltenen wässerigen Lösung diente zur Untersuchung. Echinopsin wurde in allen untersuchten Echinopsarten gefunden, so in E. albidus, banaticus, banaticus × sphaerocephalus, commutatus, dahuricus, horridus, niveus, Szowitzii, sphaerocephalus, Ritro, exaltatus, dahuricus × Ritro, banaticus × dahuricus. Von den Bastarden führt E. banaticus × dahuricus fast kein Echinopsin im Gegensatz zu dem reichlichen Echinopsingehalt der Eltern.

Über das Verhalten bei der Keimung siehe die Arbeit von Klein und Schusta.

[1]) L. Lutz, Localisation des principes actifs dans les Sençons, Bull. Soc. bot. France, 1895, XLII, S. 486.

[2]) G. Klein u. F. Schusta, Der mikrochemische Nachweis der Alhaloide in der Pflanze; XV. Der Nachweis von Echinopsin, Oesterr. bot. Ztschr., 1930, LXXIX, S. 231.

Glykoside (Heteroglykoside, Heteroside)

Als Glykoside bezeichnete man ursprünglich Stoffe, die durch Hydrolyse in Glykose und ein Nichtkohlenhydrat zerfallen. Man hat diese Bezeichnung beibehalten auch als man später fand, daß statt oder neben Glykose andere Zuckerarten mit dem Nichtkohlenhydrat verbunden sein können. van Rijn hat dann den Vorschlag gemacht, diejenigen Stoffe der ganzen Gruppe, die Verbindungen der Glykose sind, als Glukoside von der Gesamtgruppe der Glykoside zu unterscheiden. Für das bei der Hydrolyse entstehende Nichtkohlenhydrat hat sich das von mir vorgeschlagene Wort Aglykon[1]) allgemein eingeführt.

Eine rationelle Einteilung der Glykoside hat vor allem die Art und Weise zu berücksichtigen, in der die Bindung des Aglykons an den Zucker, der auch ein Disaccharid oder Polysaccharid sein kann, erfolgt. Als Glykoside in engerem Sinn kann man diejenigen bezeichnen, bei denen die Karbonylgruppe des Zuckers zur Bindung dient. Es sind dies die Halbazetale der Zuckerarten. Zu dieser Gruppe gehört die überwiegende Mehrzahl der Glykoside. Eine zweite Gruppe sind Äther der Zuckerarten; die Bindung erfolgt demgemäß durch eine der alkoholischen Gruppen des Zuckers. Eine dritte Gruppe sind die Zuckerester; bei ihnen ist ein Wasserstoffatom einer Hydroxylgruppe (oder mehrere) des Zuckers durch einen Säurerest ersetzt. Beispiele dafür findet man besonders unter Tanniden (Gerbstoffe).

Die weitere Einteilung der Glykoside erfolgt nach der chemischen Natur des Aglykons[1]). Verhältnismäßig gering ist die Zahl der Glykoside mit aliphatischem stickstoff- und schwefelfreiem Aglykon (Convolvulaceen-Glykoside, Geraniolglykosid), zahlreich sind Glykoside mit aromatischem Aglykon. Ein stickstoffhaltiges Aglykon findet sich bei Blausäure-, Indoxyl- und Alkaloid-Glykosiden, ein schwefel- und stickstoffhaltiges bei den Senfölglykosiden.

Die Spaltung kann in einzelnen Fällen durch Kochen mit Wasser oder trockenes Erhitzen herbeigeführt werden, immer durch Erhitzen mit verdünnten Säuren, fast immer durch Einwirkung von Enzymen, also auch durch Mikroorganismen, die solche Enzyme besitzen oder erzeugen. Eine große Anzahl von Glykosiden ist synthetisch hergestellt worden.

In der Zelle kommen die Glykoside, die im isolierten Zustande teils kristallinisch, teils amorph sind, meist in gelöster Form vor. Sie treten vielfach in chlorophyllhaltigen (Blätter, Rindenparenchym) und anderen parenchymatischen Zellen (Wurzeln) auf, fehlen auch nicht in Samen und Früchten, in Milchsäften und in Sekretzellen. Viele Glykoside sind an Gerbstoffe gebunden. Die Gerbstoffglykoside bevorzugen Epidermis und äußeres Rindenparenchym. Die Glykoside werden in der Pflanze von Enzymen begleitet; beide Stoffe sind in der lebenden Zelle räumlich voneinander getrennt. Die Enzyme (s. d.) besorgen den Auf- und Abbau der Glykoside.

Die physiologische Bedeutung der Glykoside ist sicher in mehr als einer Richtung zu suchen. Das ergibt sich schon aus der großen Mannigfaltigkeit der

[1]) L. Rosenthaler, Zur Einteilung der Glykoside, Pharmazeut. Zentralh., 1907, XLVIII, S. 949.

Aglykone und der mannigfachen Art der mit ihnen verbundenen Zucker. In vielen Fällen (Phenolglykoside, Blausäureglykoside) hat sicher die Bindung des Aglykons an einen Zucker den Sinn, Stoffe, die für die Zelle schädlich sein können, unschädlich zu machen. Hand in Hand damit geht in zahlreichen Fällen (Oxynitrile, Anthrachinone, Flavone) das Bestreben, unlösliche Aglykone in eine wasserlösliche Form zu bringen und sie damit beweglich zu machen. Auch darüber dürfte kein Zweifel bestehen, daß die Pflanze die Fähigkeit besitzt, den Zuckeranteil der Glykoside wieder in den Stoffwechsel hinein zu beziehen, zum wenigsten wenn dieser aus Glykose besteht. Daraufhin deuten schon die Versuche von Weevers, der in einigen Fällen z. B. bei der Weide feststellte, daß das Glykosid bei Tag im Blatt zu-, in der Rinde abnimmt, während bei Nacht der umgekehrte Vorgang stattfindet und daß gleichzeitig eine umgekehrte Bewegung mit dem Brenzkatechin stattfindet, das offenbar in genetischer Beziehung mit dem Saligenin, dem Aglykon des Salicins, steht.

Nach Bridels[1]) u. Brackes Versuchen an Enzian und Menyanthes trifoliata einerseits, Rhinanthus cristagalli und Melampyrum arvense andererseits besteht ein Unterschied zwischen den ausdauernden und den einjährigen Pflanzen. Erstere benutzen als Reservestoffe normalerweise ihre Kohlenhydrate und ziehen ihre Glykoside nur im Notfalle heran, wenn ihre normalen Reservestoffe erschöpft sind. Die einjährigen Pflanzen ziehen wenigstens einen Teil ihrer Glykoside bei der Keimung ihrer Samen heran.

Aus seinen Versuchen an Digitalis purpurea schließt Wasicky[2]), daß der Zuckerspaltling zwar gegebenenfalls für die Pflanze nutzbar gemacht werden kann, daß aber die Prozesse des Aufbaus und der Spaltung der Glykoside in erster Linie eine Rolle im Regelungsmechanismus des Turgordrucks beanspruchen.

Die Verbreitung der Glykoside im Pflanzenreich ist eine außerordentlich große. So fand Bourquelot Glykoside in 205 von 281 untersuchten Pflanzen und die neuderdings durch Bridel und seine Schüler erweiterte Methodik läßt keinen Zweifel darüber, daß die Zahl der glykosidführenden Pflanzen sich immer noch beträchtlich erweitert.

Zum mikrochemischen Nachweis von Glykosiden[3]) kommen in Betracht: I. Hydrolyse mit nachfolgendem Nachweis des Aglykons. Die Hydrolyse kann vorgenommen werden 1. durch Enzyme, 2. durch Kochen mit Säuren, 3. durch Mikrosublimation. II. Farbenreaktionen. III. Fällungsreaktionen. IV. Biologische Reaktionen (z. B. Hämolyse).

Niethammer fand, daß Glykoside im Vakuum bei etwa 350° langsam sublimieren (Zeitschr. Untersuchung Lebensm. 1930, LIX, S. 418).

---

[1]) M. Bridel, Le rôle des glucosides dans les plantes, Rev. gén. sciences pures et appl., 1926, XXXVII, S. 134.

[2]) R. Wasicky, Ein Beitrag zur Kenntnis der Rolle der Pflanzenglykoside, Bioch. Zeitschr., 1921, CXIII, S. 1.

[3]) L. Rosenthaler, Mikrochemischer Nachweis und Lokalisations-Ermittlung von Glykosiden, Pregl-Festschrift, 1929, S. 302.

Trotz der zahlreichen im Vorhergehenden skizzierten Hilfsmittel zum mikrochemischen Nachweis von Glykosiden ist die Ermittlung der Lokalisation der Glykoside, also ihr Nachweis an ihrem ursprünglichen Ort in der Zelle noch mit vielen Schwierigkeiten verknüpft.

Am einfachsten liegt die Sache, wenn ein Glykosid in der lebenden Zelle bereits auskristallisiert, wie dies Brunswik bei Anthurium Binotii beobachtet hat; auch in denjenigen Fällen, in denen die Glykoside beim Austrocknen der Pflanzenteile kristallisieren, wie so oft in der Hesperidingruppe, dürfte der Ort der Kristalle identisch sein mit dem des ursprünglich gelösten Stoffes. Nicht ganz so sicher ist dies, wenn die Überführung in den festen Zustand durch Weingeist und dergleichen geschieht. Im übrigen bietet gerade die Gruppe der Hesperidine ein Beispiel dafür, wie falsch es ist, aus dem Aussehen solcher Kristalle und einigen oberflächlichen Reaktionen auf die Gegenwart eines bestimmten Glykosides zu schließen. Denn die meisten der so als Hesperidin angesprochenen Kristalle haben sich nicht als Hesperidin erwiesen. In manchen Fällen lassen sich kristallinische Fällungen in der Zelle auch durch plasmolysierende Mittel erzielen. Aber auch, wenn dies nicht der Fall ist, wendet man die Plasmolyse häufig als vorbereitende Maßnahme an, da dadurch die Lokalisationsermittlung mit Hilfe spezifischer Reagentien erleichtert und sicherer wird. In allen Fällen, in denen die Ermittlung der Lokalisation durch chemische oder biologische Reaktionen versucht wird, müssen Kontrollproben mit Schnitten vorgenommen werden, in denen das Glykosid durch ein geeignetes Lösungsmittel (in der Regel genügt wiederholtes Auskochen mit verdünntem Weingeist) entfernt wurde. Nur so ist es einigermaßen möglich, sich vor Irrtümern zu schützen. Überhaupt muß darauf hingewiesen werden, daß einwandfreie Lokalisationsermittlungen durchaus nicht so leicht sind, wie sich dies manche Autoren vorstellen.

I. Hydrolyse mit nachfolgendem Nachweis des Aglykons. Unter den hier vorliegenden Möglichkeiten kommt für die Lokalisationsermittlung in erster Linie die enzymatische Hydrolyse in Betracht. Sie ist beispielsweise von Rosenthaler und Seiler zum Nachweis der Lokalisation von Blausäureglykosiden verwendet worden, indem sie die frei werdende Blausäure auf mit ein wenig Jod imprägnierte Stärkekörner einwirken ließen.

Es muß aber davor gewarnt werden, den Nachweis eines Spaltungsproduktes als Beweis für das Vorhandensein eines bestimmten Glykosides zu betrachten. Findet man z. B., nachdem man sich von der Abwesenheit von freiem Hydrochinon überzeugt hat, dieses nach Vorbehandlung mit Emulsin oder Salzsäure, so ist es zwar wahrscheinlich, daß Arbutin vorhanden war. Denn Arbutin ist bisher das einzige bekannte Hydrochinonglykosid. Aber sicher ist dieser Schluß bei einer Pflanze, aus der Arbutin nicht bereits makrochemisch untersucht wurde, nicht. Denn es könnte auch einmal ein anderes Hydrochinon-Glykosid vorkommen.

II. Von den Farbenreaktionen sind die vielfach angewandten allgemeinen Kohlenhydratreaktionen völlig abzulehnen, da sie eben außer mit den Glykosiden mit den stets vorhandenen Kohlenhydraten reagieren. Auch die Reaktionen mit konzentrierter Schwefelsäure führen infolge des Eintretens der Raspailschen (Kohlenhydrat-Eiweiß-Reaktion) häufig zu Irrtümern. Auch dadurch ist

die konzentrierte Schwefelsäure wenig zu Lokalisationsermittlungen geeignet, daß sie die Stoffe rasch herauslöst und so die Färbungen auch in Zellen auftreten läßt, in denen das Glykosid nicht ursprünglich vorhanden war und außerdem dadurch, daß sie zarte Schnitte rasch zerstört. Die zuletzt genannten Nachteile lassen sich in vielen Fällen dadurch vermeiden, daß man die Schwefelsäure mit Wasser oder Weingeist verdünnt. So verwendet man zum Nachweis des Strophanthins eine 80proz. Schwefelsäure; bringt man einen Schnitt durch das Rhizom von Polygonatum multiflorum in ein Gemisch gleicher Teile Weingeist und Schwefelsäure, so sieht man, daß einzelne Zellen sich rot färben, während bei Anwendung konzentrierter Schwefelsäure größere Partien des Rindengewebes diese Färbung zeigen. Bei den Reaktionen mit Alkalien ist es häufig von Vorteil, hochkonzentrierte Laugen, besonders auch weingeistige, zu verwenden, da dann die Möglichkeit vorliegt, daß die Farbenreaktion an der schwerlöslichen Alkaliverbindung eintritt. Noch sicherer ist die Verwendung von gasförmigem Ammoniak. Reaktionen mit Ferrichlorid sind in allen denjenigen Fällen zur Bestimmung der Lokalisation von Glykosiden ungeeignet, in denen noch andere mit Ferrichlorid reagierende Stoffe, besonders die so weit verbreiteten Gerbstoffe zugegen sind.

Auch die Anwendung von Salpetersäure ist, soweit man sie durch Nitrierung zur Erzeugung gelb gefärbter Derivate verwenden will, mit Vorsicht zu beurteilen, da sich derartige Stoffe bekanntlich aus zahlreichen aromatischen Derivaten bilden; doch kann man sich auch hier in manchen Fällen dadurch helfen, daß man eine verdünnte Salpetersäure verwendet.

III. Von den Fällungsreagentien sind die allgemeinen Alkaloidfällungsmittel auch bei Abwesenheit von Basen nur mit großer Vorsicht zu benutzen, da sie außer den höheren Kohlenhydraten[1]) auch Eiweißstoffe ausfällen. Doch sind sie in eiweißarmen, aber glykosidreichen Zellen mit Erfolg anzuwenden; daß auch Fällungen mit Ammonsulfat oder anderen Neutralsalzen kritisch beurteilt werden müssen, bedarf keiner weiteren Erörterung.

Von den speziellen Fällungsmitteln sind weder Metallsalze noch Erdalkalien spezifische Glykosidfällungsmittel, da sie ja auch mit organischen Säuren schwerlösliche Salze bilden können. Bei deren Abwesenheit sind sie in vielen Fällen recht geeignet, so zum Nachweis der Lokalisation von Saponinen durch das Verfahren von Combes. Sollen Schwermetallverbindungen von Glykosiden indirekt nachgewiesen werden, etwa dadurch, daß man sie nach Auswaschen des Reagens in Sulfide oder andere gefärbte Metallverbindungen überführt, so wirkt es häufig störend, daß manche Elemente der Gewebe, so schon die Zellulosewände Schwermetalle adsorbieren.

Die Fällungen mit Sterinen geben, soweit mir bekannt, in chemischer Hinsicht nicht zu Irrtümern Veranlassung; ihre Verwendung zur Lokalisationsermittlung ist jedenfalls mit Vorsicht zu beurteilen, da die Doppelverbindungen beim Nachweis von Sterinen mit Digitonin auch am Rand der Schnitte zu beobachten sind und wohl auch im umgekehrten Fall damit gerechnet werden muß, daß die Verbindung nicht am ursprünglichen Ort auftritt.

[1]) L. Rosenthaler, Über die Fällbarkeit von Kohlenhydraten und Glykosiden durch Alkaloidfällungsmittel, Pharmaceut. Acta Helvetiae, 1928, III, S. 93.

Nitrosodimethylanilin gibt auch Fällungen mit Gerbstoffen, ist also, wenn solche anwesend sind, nicht zu verwenden.

Die Überführung der Glykoside in Halogenderivate kann zur Lokalisationsermittlung dann mit Sicherheit herangezogen werden, wenn die Halogene in gasförmigem Zustand verwendet werden.

Bei der Verwendung der Hämolyse ist es ausgeschlossen, den Nachweis der Lokalisation für die einzelne Zelle zu führen; sie gestattet aber bei Verwendung von Blutgelatine (Kofler, Fischer) den Nachweis in einzelnen abtrennbaren Geweben.

Adonis-Glykoside

Aus Adonis vernalis L. sind zunächst zwei amorphe Glykoside dargestellt worden. Das eine ist wasserlöslich; es gibt mit Salzsäure eine Gelbfärbung, die beim Erhitzen grün wird. Unterschichten des in eisenchloridhaltigen Eisessig gelösten Glykosides mit konzentrierter Schwefelsäure (Kellersche Reaktion) gibt kirschroten Ring und Grünfärbung des Eisessigs.

Das in Wasser schwer lösliche Glykosid ist in Weingeist löslich; seine weingeistige Lösung färbt konzentrierte Salzsäure tief violettrot, beim Erhitzen dunkelgrün. Die Kellersche Reaktion ergibt braunen Ring und Blaufärbung des Eisessigs.

Beide Glykoside geben mit Nitroprussidnatrium auf Zusatz von Alkali eine dunkelrote, wieder verschwindende Färbung.

Adonidin Merck — ein Glykosidgemisch — gibt eine Fällung mit Phosphorwolframsäure und anderen sog. Alkaloidfällungsmitteln.

Neuerdings ist noch von Hoffmann, La Roche & Co. ein in Wasser schwer lösliches Glykosid dargestellt worden (Chem. Ztg. 1930, Chem. techn. Übersicht, S. 30). Näheres nicht bekannt.

Mit dem Wasickyschen Reagens (2 g p-Dimethylaminobenzaldehyd 6 g Schwefelsäure, 0,4 g Wasser) gibt Adonidin eine schmutzigviolette Färbung.

In trockenen Querschnitten der Wurzeln von Adonis vernalis erhielt Zawalkiewicz[1]) einen körnigen Niederschlag mit Phosphorwolframsäure, an manchen Stellen auch sehr dünne halbkreisförmig gebogene Kristalle. Nach dem Aufkochen fand er statt dessen in einigen Reihen des Rindenparenchyms unter der Epidermis amorphe blaugefärbte Massen. Nach Einlegen in Goldchlorid und Auswaschen entstand mit Ferrosulfat in der an die Epidermis grenzenden Parenchymschicht ein dichter schwarzer Niederschlag. Querschnitte der Rhizome und Wurzeln von Adonis vernalis färben sich nach demselben Autor mit Wasickys Reagens makroskopisch gelbbräunlich, mikroskopisch violett. Die Färbung tritt in Rhizom und Wurzeln in den ersten vier bis acht der unter der Epidermis gelegenen Reihe von Parenchymzellen ein.

[1]) Z. Zawalkiewicz, Beiträge zur Anatomie und Mikrochemie der unterirdischen Organe der Gattung Helleborus, Pharmazeutische Post, 1918, LI, S. 753.

Vanderlinden (Lit. S. 457, 1) gibt folgende Reaktionen an: Jodjodkalium (braun), Kaliumquecksilberjodid (gelbgrau), Tannin (grau)-Phosphormolybdänsäure (blaßgelb, blau werdend), Goldchlorid (gelblich, dann schwarz). Konzentrierte Schwefelsäure färbt rot. Diese Reaktiontritt am schärfsten in der Epidermis der Schuppenblätter der Basalknospen ein.

Aus Adonis aestivalis hatte Kromer ein amorphes Adonidin hergestellt. Mikrochemisch lassen sich weder Alkaloide noch Glykoside nachweisen.

Gegenüber Blutgelatine verhalten sich die unterirdischen und die oberirdischen vegetativen Teile negativ (Kohli).

Aesculin

Aesculin (Aesculinsäure, Minor, 1831), F. 160°, bildet flache, rhombische Prismen mit geraden oder wenig schief gestellten Endflächen, die schwer in kaltem Wasser und in kaltem Alkohol, leicht in heißem Wasser und heißem Alkohol löslich sind. Ein gutes Lösungs- und Kristallisationsmittel ist Methanol. In Ammoniak und in Salpetersäure lösen sie sich mit gelber Farbe. Die gelbe Lösung in Salpetersäure wird auf Zusatz von Ammoniak rot. Die wässerige Lösung fluoresziert, selbst in starker Verdünnung, intensiv blau, aber die Fluoreszenz soll nicht dem reinen Aesculin zukommen. Bei der Hydrolyse (verd. Säuren, Emulsin, Erhitzen auf 230°) entstehen Glykose und Aesculetin (Dioxycumarin). Letzteres, welches im Samen von Euphorbia lathyris vorkommt, stellt feine Nadeln (F. 270°) dar, die ähnliche Lösungsverhältnisse wie Aesculin besitzen und sich in ätzenden Alkalien mit gelber Farbe lösen. Ihre wässerige Lösung wird mit Ferrichlorid grün. Aesculin ist in der Rinde von Aesculus hippocastanum besonders reichlich im Frühjahr vorhanden, weniger im Samen und in den Blättern. Gleichzeitig ist ein spaltendes Enzym zugegen. Goris[1]) hält es für keinen Reservestoff; nach Sigmund[2]) soll es die Aufgabe haben, giftige Stoffwechselprodukte durch Bindung von Zucker in eine unschädliche Form überzuführen. Die Bildung ist vom Licht unabhängig (Weevers)[3]).

Auch muß erwähnt werden, daß Aesculin in Gelsemium sempervirens (Wurzel, von Sonnenschein angegeben) nicht auftritt und die Fluoreszenz von Gelsemium auf Gelseminsäure beruht.

Die direkte Sublimation liefert keine brauchbaren Resultate. Reines Aesculin kann allerdings unzersetzt sublimiert werden, oft findet Spaltung statt und das Sublimat besteht fast nur aus Aesculetinnadeln. Diese finden wir (aber

[1]) A. Goris, Rech. microch. sur quelq. glucosid. et quelq. tannins végét. Paris, Thèse 1903.

[2]) W. Sigmund, Natur.-med. Verein Lotos, Chem. Ztg., 1911, S. 65 und Sitzgsb. Wien. Ak., 1910, CXIX.

[3]) Th. Weevers, Untersuchungen über den Glykosidgehalt der Pflanzen in Verbindung mit dem Stoffwechsel der Pflanzen, Pharm. Weekbl., 1902, XXXIX, S. 57.

nicht zahlreich und nicht immer) in den aus aesculinhaltigen Schnitten erhaltenen Sublimaten (s. Gelseminsäure).

In der durch Erwärmen bereiteten Lösung des Aesculins in Goldchlorid entsteht bald ein kleinkristallinischer tiefblauer Niederschlag. Löst man einige Aesculinkriställchen in Chlorwasser unter Erwärmen so bilden sich bald haarförmige, nicht selten gebogene baum- und strauchartig angeordnete Nädelchen, während sich der Überschuß von Aesculin wieder in Prismen abscheidet. Erwärmt man Aesculin mit Brombromkalium, so geht jeder Aesculinkristall rasch in ein Haufenwerk feiner Nädelchen über (Tunmann)[1].

Digeriert man Aesculin mit ein wenig Wasser und Emulsin, verdampft dann das Wasser bei mäßiger Wärme und erhitzt dann stärker,

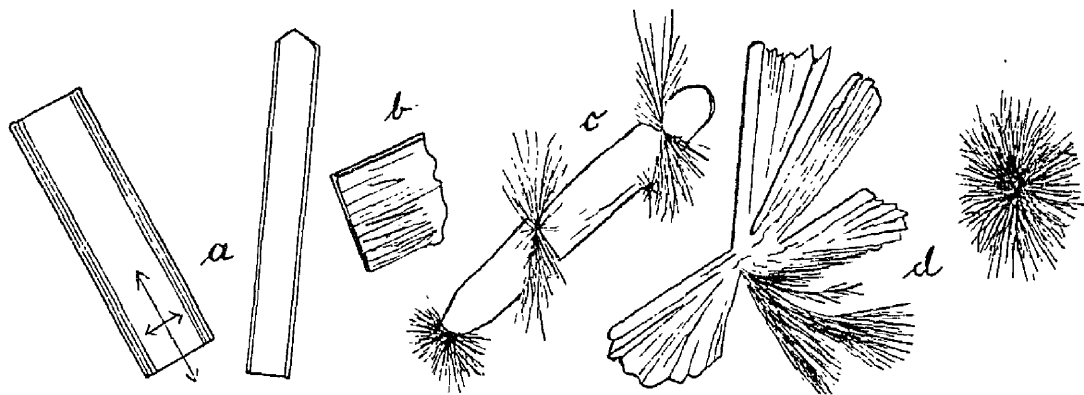



Fig. 134. *a*) u. *b*) Aesculin, *c*) u. *d*) Dibromaesculin

so erhält man ein Sublimat, das Kristalle (meist beiderseits zugespitzte Spindeln) von Aesculetin enthält. Sie lösen sich in Lauge und gelblicher Farbe.

Aesculin erscheint in den jungen Schößlingen, dann in der Plumula; die Kotyledonen von Aesculus führen kein Aesculin (Weevers).

Zum mikrochemischen Nachweis des Aesculins bringt Goris die Schnitte 2—4 Stunden in Salpetersäure (spez. Gew. 1,33), die 0,2—0,3 % Eisen enthält und dann in Ammoniak. Sobald man — nach einigen Minuten — eine Rosa- oder Violettfärbung eintreten sieht, bringt man die Schnitte in Glyzerin.

Die Zuverlässigkeit des Gorisschen Verfahrens ist von Cazzani[2])

[1]) O. Tunmann, *Zur Mikrochemie des Aesculins und zum Nachweis dieses Körpers in Aesculus hippocastanum L.*, Schweiz. Apoth.-Ztg., 1916., LIV, Nr. 5.

[2]) E. Cazzani, Kritische Bemerkungen über den Aesculinnachweis von Goris; s. Ref. von E. Küster, Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., 1904, XXI, S. 390.

angezweifelt worden. Für die von Goris bei Aesculus hippocastanum L. und Pavia rubra Moench erhaltenen Resultate sei deshalb auf die Dissertation von Goris und sein Buch Localisation et rôle des alcaloides et glucosides S. 288 verwiesen.

Legt man Schnitte in Brombromkalium, so entstehen in den Zellen. auf und in den Schnitten Kristalle von Dibromaesculin (Fig. 134 u. 135), Man beläßt die Schnitte einige Stunden unter Deckglas im Reagens und hellt dann mit Glyzerin oder noch besser mit Anilin auf. Die gelblichen Sphärite gehen dabei durch Entfernung des überschüssigen Broms in fast farblose Nadeln über (Tunmann).

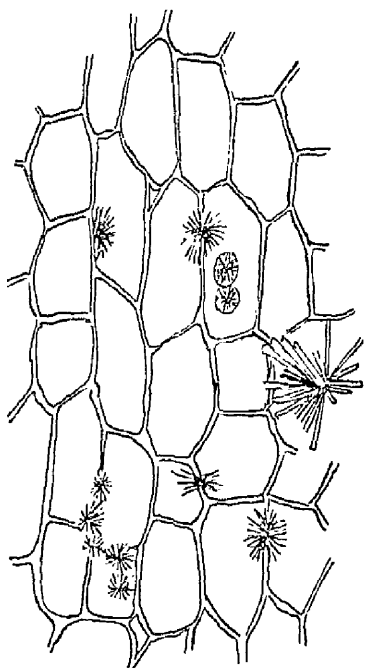



Fig. 135. Dibromaesculin in der Rinde von Aesculus hippocastanum (Tunmann)

Klein und Linser[1]) prüfen auf die Anwesenheit von Aesculin und Fraxin mit dem Fluoreszenzmikroskop. Zur makroskopischen Beobachtung wurden die möglichst frischen oder mit Äther, Petroläther oder Tetrachlorkohlenstoff befeuchteten Gegenstände mit einem reinen, vorher auf Fluoreszenzfreiheit geprüften Messer quer oder längs geschnitten, so daß schöne ebene Schnittflächen vorhanden sind. Dann bringt man den Gegenstand in den Kegel des ultravioletten Lichtes, der sich zwischen der Filtergarnitur und dem Quarzprisma des Mikroskopes befindet. Die glykosidhaltigen Teile leuchten eine Zeitlang intensiv blau. Zur mikroskopischen Betrachtung bringt man Mikrotomschnitte durch frisches Material trocken zwischen Deckglas und Objektträger und versetzt unmittelbar vor dem Beobachten mit Äther oder Petroläther. Man ergänzt die verdunstende Flüssigkeit, bis die Beobachtung abgeschlossen ist.

Die fluoreszierenden Glykoside finden sich nach Klein und Linser hauptsächlich in den inneren Rindengewebsschichten, in den Bastfasern, immer in den Knospenschuppen, ferner in der Markkrone, manchmal auch im Mark. Die Samen bilden bei Beginn der Keimung um den Embryo herum fluoreszierenden Stoff. In Organen, die nicht assimilieren und ihr Längenwachstum vollendet haben, ist die Lokalisation qualitativ das ganze Jahr über gleich.

[1]) G. Klein u. H. Linser, Fluoreszenzanalytische Untersuchungen von Pflanzen, Oesterr. bot. Ztschr., 1930, LXXIX, S. 125.

Anthochlor[1])

Anthochlore werden von den Botanikern Blütenfarbstoffe genannt, die im Zellsaft gelöst sind und blaß-, zitronen- oder dunkelgelb sind. Anthochlore finden sich auch in Früchten, Blättern und Stengeln, und im herbstlichen Laub. Die ersten Angaben über einen derartigen Farbstoff rühren von Fremy und Cloëz[2]) her. Weitere historische Angaben siehe bei G. Klein[1]). In chemischer Beziehung handelt es sich zum Teil um Stoffe, die den Flavon-Glykosiden nahestehen.

Zur Unterscheidung von Carotin, das immer an die Chromoplasten gebunden ist, genügt es, einen Schnitt durch die Blumenblätter zu machen und festzustellen, ob der Zellsaft gelb gefärbt ist.

Die Löslichkeitsverhältnisse sind etwa dieselben wie die der Anthocyane, zu denen sie sich reduzieren lassen.

Mit Laugen, auch verdünnten, und konzentrierter Schwefelsäure geben sie Farbenreaktionen. Eine Gruppe gibt rote Farbentöne, eine zweite (Papaver) dunkelgelbe bis orangegelbe, eine dritte (Verbascum) mit Säuren grüne bis braune, mit Alkalien tiefgelbe Kristallisationsprodukte. Mit Metallsalzen geben sie gefärbte Niederschläge; gebeizte Faser wird schwach angefärbt.

Durch verschiedene Lösungsmittel kann man die Farbstoffe direkt aus den Blumenblättern kristallisieren.

Wahrscheinlich handelt es sich teilweise um Glykoside.

Die Anthochlore haben ihren Sitz immer in der Epidermis; kommen sie zusammen mit Karotin vor, so trifft man das Karotin allein im Grundgewebe, in den Oberhautzellen beide Farbstoffe in einer und derselben Zelle.

Nach Schmid und Waschkan[3]) ist das Anthochlor der gelben Dahlien nichts anderes als Apigenin, also ein Flavonderivat.

Anthocyane

Die in der neueren Zeit von Willstätter und seinen Schülern dann von Karrer u. a. näher studierten Anthocyane sind die blauen, violetten und roten Farbstoffe der Blüten vieler Früchte, mancher Blätter und unterirdischer Organe. Sie lie-

[1]) G. Klein, Studien über das Anthochlor. Sitzgsber. Wiener Akad. Wissenschaft. Math. naturw. Kl. Abt. I, 1920, CXXIX, S. 341 und 1921, CXXX, S. 247.

[2]) Fremy u. Cloëz, Note sur les matières colorantes des fleurs, Journ. pharm. chim., 1854, XXV, S. 241.

[3]) L. Schmid u. A. Waschkan, Über die Konstitution des Anthochlors der gelben Dahlien, Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien, Math. nat. Kl., Abt. IIb, 1928, CXXXVII, S. 83.

fern durch Hydrolyse neben Zuckern und eventuell noch anderen Stoffen stets als eigentlichen Träger der Farbe ein Anthocyanidin, das auch durch Reduktion eines entsprechenden Flavonderivates hergestellt werden kann. Fast immer kommen mehrere Anthocyane zusammen vor. Die Anthocyane sind in Wasser oder verdünntem Weingeist löslich, in Äther unlöslich, von den Anthocyanidinen ist immer ein Teil in Wasser löslich, dagegen lösen sie sich in Methyl- und Äthylalkohol.

Anthocyane und Anthocyanidine sind infolge basischen Sauerstoffs schwache Basen, die mit Säuren z. T. gut kristallisierende Salze bilden. Die Färbung ist abhängig von der Reaktion. So wird das in weingeistiger Lösung mehr rot- als violettstichige Päonin mit Soda kornblumenblau, mit Natriumazetat violett, mit Natronlauge blau (beim Stehen in Grün übergehend). Unter bestimmten Umständen können sie außerdem in die farblosen Pseudobasen übergehen. Diese Verhältnisse sind geeignet, manche Beobachtungen zu erklären.

Die Blüten von Myosotis dissitiflora sind bei niederer Temperatur rot, bei höherer Temperatur blauviolett oder blaßblau und die Blüten von Ipomoea rubrocoerulea sind bei höherer Temperatur himmelblau, bei niederer violettrot (Hildebrand)[1]. Nach Fitting[2]) sind Erodium-Blüten bei niederer Temperatur blau, bei höherer rosa, bei sehr hoher Temperatur farblos. Die mit Chloroform oder Wasserdampf abgetöteten Blüten zeigen die gleichen Farbenumschläge. „Auch die in Wasser gelösten Rückstände der Alkoholextrakte aus den Blüten zeigen entsprechende reversible Farbenänderung bei Erwärmung."

Anthocyan bildet sich unabhängig vom Lichte. Nur bei Syringa persica ist die Anthocyanbildung vom Licht abhängig (Karzel). Bei der Entwicklung der Anthocyane findet gleichzeitig eine andere Ausbildung und Verteilung der Nährstoffe statt (Tischler)[3], die Zunahme der Glykoside und des Zuckers ist mit einer Abnahme an Dextrin (?) verbunden (Combes)[4]. Das Verschwinden des Anthocyans aus den jugendlichen Blättern ist von einem Sauerstoffverbrauch begleitet, der den normalen weit übersteigt. Die Anthocyane dienen Blüten, Früchten und Samen als Lockmittel; jugendlichen Pflanzenteilen dienen sie zum Schutz für das in Bildung begriffene Chlorophyll, indem sie strahlenabsorbierend und dadurch erwärmend wirken (Stahl)[5]. Der Grund der herbstlichen Anthocyanbildung ist noch nicht völlig klargelegt[6].

[1]) F. Hildebrand, Einige biologische Beobachtungen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1904, XXII, S. 473.

[2]) H. Fitting, Über eigenartige Farbenänderung von Blüten und Blütenfarbstoffen, Zeitschr. f. Bot., 1912, IV, S. 81.

[3]) G. Tischler, Über die Beziehungen der Anthocyanbildung zur Winterhärte der Pflanzen, Beih. Bot. Centralbl., 1905, $XVIII_1$, S. 452.

[4]) R. Combes, Biochem. Unters. über die Entwicklung des Anthocyans bei den Pflanzen, Compt. rend., 1909, CXLVIII, S. 790.

[5]) E. Stahl, Über bunte Laubblätter, Ann. d. jard. bot. Buitenzorg, 1896, XIII, S. 137.

[6]) M. Miyoshi spricht von Abfall- und Todesanthocyanbildung (Über die Herbst- und Trockenröte der Laubblätter), Journ. of. Univ. of Tokyo, 1909, XXVII.

Die Anthocyane der gefärbten Blüten dienen neben den Flavonen als Lichtschutz, das herbstliche Auftreten der Anthocyane ist lediglich der Reduktion der vorhandenen Flavonglykoside zuzuschreiben (Shibata u. Kishida).

In jungen roten und ausgewachsenen grünen Blättern von Polygonum compactum Hook. findet sich im Frühjahr nach Noack[1]) ein Chromogen, das sich wie eine Anthocyanidinpseudobase verhält, ferner kommt eine gelbe Oxydationsstufe des Anthocyanidins vor. Das Verschwinden des Anthocyans bei derselben *Pflanze im Frühjahr beruht vermutlich auf einer fermentativen Hydrolyse des* Anthocyanins und der Umwandlung des abgespaltenen Anthocyanidins in die farblose Pseudobase.

Nur solche Pflanzen können rote (anthocyanin- oder hämakarotinoidführende) „Herbstblätter" bilden, die unter günstigen Bedingungen auch in ihren noch lebenskräftigen Assimilationsorganen diese Verbindungen enthalten (Lippmaa[2])).

Zu den Anthocyanen zählt auch das Hypericin in den Sekretbehältern der oberirdischen Organe der Hypericineen. In saurer Lösung erscheinen die Drüsen rot, in alkalischer blaugrün[3]).

Die Anthocyane bilden sich entweder in Chondriokonten[4]), die Hantelform annehmen und dann durch Auflösung des Mittelstücks in zwei gefärbte Körperchen zerfallen oder wie bei Iris germanica in einem sphärischen Körperchen, das aus einer körnigen Mitochondrie hervorgeht (Cyanoplast Politis).

In Azolla filiculoides wird das Anthocyan von körnigen Mitochondrien sezerniert, die früh in die zentrale Vakuole wandern. Sie imprägnieren sich mit einem Phenol, das allmählich in das Anthocyan übergeht. In der rot gewordenen Zelle sind die Anthocyan-Körperchen in der Vakuole gelöst (Mirande)[5]).

Anthocyan kommt meist im Zellsaft gelöst vor, doch soll es nach Karzel[6]) auch an Kugeln und an ähnliche Gebilde (Vakuolen?) ge-

[1]) K. Noack, Untersuchungen über den Anthocyanstoffwechsel auf Grund der chemischen Eigenschaften der Anthocyangruppe. Zeitschr. f. Bot., 1918, X, S. 561.

[2]) Th. Lippmaa, Über Pigmenttypen und ihre Bedeutung für die Anthocyaninfrage, Ber. deutsch. bot. Ges., 1928, XLVI, S. 267.

[3]) E. Siersch, Anatomie und Mikrochemie der Hypericum-Drüsen, Chemie des Hypericins, Planta, 1927, III, S. 481.

[4]) A. Guilliermond, Sur la formation de l'anthocyane au sein des mitochondries (Compt. rend. Ac. sciences, Paris, 1913, CLVI, S. 1924. — Derselbe, Nouvelles recherches cytologiques sur la formation des pigments anthocyaniques, Cpt. rend. Ac. sciences Paris, 1913, CLVII, S. 1000. — Derselbe Recherches cytologiques sur la formation des pigments anthocyaniques, Nouvelle contribution a l'étude des mitochondries, Rev. gén. Bot., 1914, XXV bis S. 295.

[5]) M. Mirande, Observation sur le vivant de la formation cytologique de l'anthocyanine, Compt. rend. Acad. sciences, Paris, 1916, CLXIII, S. 368.

[6]) R. Karzel, Beitr. z. Kenntn. d. Anthocyans in Blüten, Österr. bot. Zeitschr., 1906; ferner J. Friedel, Compt. rend., 1911, CLIII, S. 825.

bunden sein. Overton[1]) sah im Mesophyll von Lilium martagon schwarzrote kugelige Bildungen, Hildebrand[2]) dergleichen bei den Blüten von Tillandsia amoena, Amorpha fructicosa, Gilia tricolor, Verbena chamaedrifolia. Außerdem treten bereits in den lebenden Zellen neben dem violetten Zellsaft blaue, blauschwarze und violette Ausscheidungen auf (Zimmermann)[3]). Häufig trifft man violette Ausscheidungen in der Epidermis der Blumenblätter der Delphinium-Arten. Die Ausscheidungen haben ganz verschiedene Formen. Man trifft in dem violetten Zellsaft kleine zarte Nadelsterne, strauchartig verzweigte Nadelgruppen, runde körnige Gebilde, Nadeldrusen u. a. Wahrscheinlich zählen hierher die von Politis[4]) angegebenen „Cyanoplasten" von Billbergia (Perigon), die sich in Glyzerin, 1proz. Essigsäure, 1proz. Salzsäure, stark verdünnten Alkalien, Chloroform, Weingeist, Äther, verdünntem Weingeist und Wasser lösen. Ebenso sollen die von Tschirch[5]) angegebenen blauschwarzen Chromatophoren der Früchte von Coffea arabica nach Kroemer[6]) Farbstoffkristalle sein. In Coffea treten in der Epidermis neben rotem Zellsaft kugelige, wulstige Formen auf, in den subepidermalen Zellen Nadelsterne. Weitere Beispiele von amorphem und kristallisiertem Anthocyan in den lebenden Zellen (Fig. 136) verdanken wir Molisch. „Namentlich da, wo auf der Blumenkrone dunkle Flecke, Makeln, dunkle Adern auftreten, kann man mit einiger Wahrscheinlichkeit auf festes Anthocyan rechnen." Auch niedere Temperaturen begünstigen die Bildungen von Anthocyankristallen (Brassica oleracea, Begonia maculata). Anthocyanausscheidungen finden sich in: Pelargonium zonale (Sphärite), P. Odier hortorum, Rosa, Dianthus caryophyllus L. (Sphärite), Vitis sp., Antirrhinum majus, Anagallis arvensis (tiefblaue Nadeln und Sterne), Aquilegia atrata, Lathyrus heterophyllus (Büschel und Sterne), Cytisus laburnum (Klumpen), Medicago sativa, Hedysarum coronarium, Ononis Natrix, Nemophila sp., Baptisia australis, Erodium Manescari.

[1]) E. Overton, Beobachtungen und Versuche über das Auftreten von rotem Zellsaft bei Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1899, XXXIII, S. 206.

[2]) F. Hildebrand, Anatomische Unters. über die Farbe der Blüten, Jahrb. f. wiss. Bot., 1863, III, S. 59.

[3]) A. Zimmermann, Bot. Mikrotechnik, 1892, S. 104 und Ad. Weiß, Sitzgsb. Wien. Akad., 1866, LIV_1.

[4]) J. Politis, Sopra speciali corpi cellulari che formano antocianine, Atti r. ac. dei linc., 1911, XX, S. 828.

[5]) A. Tschirch, Violette Chromatophoren in d. Fruchtsch. d. Kaffee, Schw. Wchschr. Chem. u. Pharmaz., 1898, XXXVI, S. 452.

[6]) K. Kroemer, Angebl. Vorkommen v. violetten Chromatophoren, Bot. Centralbl., 1900, LXXXIV, S. 33.

Solereder[1]) fand kugelige, indigoblau gefärbte von einer besonderen Hülle umschlossene Anthocyankörper „Cyanocysten" in den Blattstielen von Cyanastrum cordifolium Oliv.; nicht identisch mit den von Politis angegebenen Cyanoplasten (s. oben).

Anthocyan findet sich in fester Form in den Balgfrüchten von Decaisnea Fargesii (subepidermale Schichten des Fruchtperiblems) und besonders dicht im Parenchym der Leitbündelscheiden und in den Beeren einer Fuchsia (in den Leitbündelparenchymscheiden)[2]).

Bei manchen Borragineen ist das Anthocyan in Vakuolen an eine gallertig-feste Substanz gebunden[3]).

Gertz[4]) fand die Anthocyane in einigen Fällen als Solitärkristalle (Solanum nigrum und Bertolonia marmorata), in anderen raphidenähnlich (Crinum amabile u. a.) oder als Trichiten und Dendriten ausgebildet (Crocus vernus, Fagus silvatica u. a.). Sie können in einer und derselben oder in benachbarten Zellen verschiedene Formen besitzen. Meistens sind sie amorph, auch flüssig. In diesen Fällen handelt es sich zum Teil um Stoffe, die nur durch Anthocyan gefärbt sind. bei Aechmea Wailbachii und Convallaria majalis finden sich Gerbstofftropfen, die durch Anthocyan gefärbt sind.

Es ist erforderlich, zu Studien über das Vorkommen von festem Anthocyan nur lebendes Material in toto trocken zu durchmustern. Wiederholt hat Tunmann gefunden, daß bereits bei Zutritt von wenig destilliertem Wasser im homogenen Farbstoff Klumpen, Ballen und fettartige Tröpfchen hervortreten, die schnell den Farbstoff speichern und so festes Anthocyan vortäuschen. Man zupft am besten mit der Pinzette die Epidermis ab und legt sie trocken unter Deckglas. Bei diesen Ausscheidungen benutzt man als Reagentien: 1proz. Chromsäurelösung, frisch bereitete Eisenvitriollösung (1 : 10), basisches Bleiazetat und Alkalien, wodurch Farbenreaktionen erzielt werden.

Bekannt ist das Speicherungsvermögen der Zellwände für Farbstoffe. Auch Anthocyan wird bisweilen gespeichert. Immerhin tritt Anthocyanspeicherung selten ein. Naegeli und Schwendener[5]) fanden, daß der aus der Samenschale

[1]) H. Solereder, Über die Cyanocysten von Cyanastrum cordifolium Oliv., Beihefte z. bot. Centralbl., 1916, XXXIII, S. 298.

[2]) K. Starmace, Das feste Anthocyan in Decaisnea- u. Fuchsia-Früchten, Acta Soc. Bot. Polon., 1928, S. 246. Ref. in Bot. Centralbl., 1929, CLVI, S. 406.

[3]) J. Gicklhorn u. F. Weber, Über Vakuolenkontraktion u. Plasmolyseform, Protoplasma, 1926, I, S. 427.

[4]) O. Gertz, Nya iakttagelser öfver anthocyan kroppar, Svensk. Bot. Tidskr., 1914, VIII, S. 456, Ref. in Bot. Centralbl., 1915, CXXVIII, S. 456.

[5]) C. Naegeli u. S. Schwendener, Das Mikroskop, II. Aufl., 1877, S. 504.

von Abrus precatorius extrahierte Farbstoff mit Anthocyan übereinstimmte und zeigten, daß der Farbstoff roter Blumenblätter farblose Membranen färbte.

Zur Kristallisation des Anthocyans außerhalb der Zelle dienen als gutes Versuchsobjekt Blumenblätter von Pelargonium zonale (Molisch[1])). Man hat nur nötig, die Blätter unter dem Deckglas zu zerquetschen, damit der rote Zellsaft in Freiheit gelangt, den man langsam eindunsten läßt und so zur Kristallisation bringt. Mit Vorteil läßt sich auch Essigsäure (oder Salzsäure) benutzen, welche die Zellen abtötet, den Farbstoff aufnimmt und ihn beim Verdampfen in Form von feinen Nädelchen, Garben, Pinseln, Sphärokristallen von tief karminroter Farbe ausfallen läßt. Die schönsten Kristalle finden sich besonders unter dem Rande des Deckglases. Auch die Blätter des jeder-

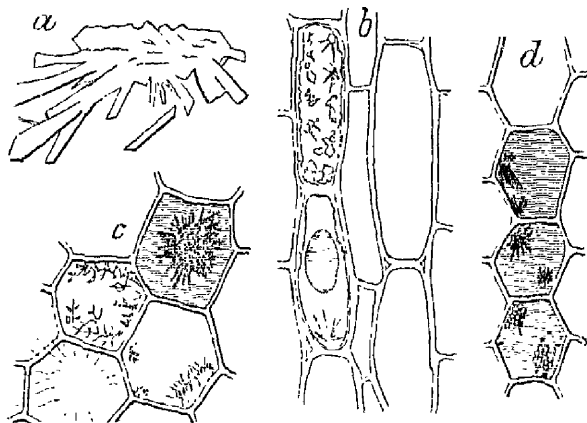



Fig. 136. Anthocyanausscheidungen in lebenden Zellen (Schnitte ohne Wasserzusatz). Ricinus communis, a) schwarzblaue Kristalle in subepidermalen Zellen, b) bläuliche Kristalle und rötliche Ballen in der Markperipherie. c) Digitalis purpurea, Epidermis der Flecke der Staubbeutel, stahlblau moosartige Gebilde und Klumpen von undeutlich kristallinischer Struktur. d) Klugia ceylanica, Epidermis der Blüte (Tunmann)

zeit zur Verfügung stehenden Rotkrautes (Brassica oleracea capitata) geben die Reaktion. Ebenso läßt sich 10proz. Salzsäure verwenden. Es ist aber unbedingt notwendig, dafür zu sorgen, daß die Verdunstung der Lösungen nur sehr langsam erfolgt. Erfolgte die Verdunstung innerhalb 2—3 Stunden, dann erhielt Tunmann nur schmierige Massen. Je langsamer die Verdunstung vor sich ging, um so schöner waren die Kristalle. Bei vielen Objekten läßt sich die Kristallisation aber auf keine Weise erzielen.

Zur Unterscheidung der Anthocyane von ähnlichen Farbstoffen empfehlen Buscalioni und Pollacci[2]) eine verdünnte gelbliche Lösung von Nikotin, in welche die Objekte eingetaucht werden. Nur Antho-

[1]) H. Molisch, Über amorphes und kristallisiertes Anthocyan, Bot. Ztg., 1905, LXIII, S. 145.

[2]) L. Buscalioni e G. Pollacci, Le Antocianine ed il loro significato biologico nelle piante, Atti dell' Ist. bot. Pavia 1903, N. S. VIII.

cyane verfärben sich hierbei und zwar ist der Farbenumschlag bei verschiedenen Pflanzen verschieden, grün (Tradescantia, Cissus, Chrysanthemum u. a.), blau (Canna, Hibiscus, Dahlia u. a.), violett (Salvia), gelbbraun (Tropaeolum).

Nach Combes[1]) hat der rote Farbstoff in den Blättern von Ampelopsis hederacea eine andere Zusammensetzung wie der sich im Herbst bildende. Ersterer läßt sich in purpurroten Nadeln isolieren und gibt mit neutralem Bleiazetat eine grüne Verbindung, letzterer, der hellbraune Nadeln darstellt, geht mit neutralem Bleiazetat eine gelbe Verbindung ein. Die Farbstoffkristalle lösen sich leicht in Alkohol, schwer in Wasser und sind in Äther, Benzol und Toluol unlöslich.

Eie Diatomee, Navicula ostrearia Gaill., führt (Lankester, Molisch[2])) blauen Farbstoff und zwar soll der Farbstoff nach ersterem nicht in den Vakuolen sondern im Plasma lokalisiert sein. Nähere mikrochemische Angaben fehlen.

Ein Teil der Anthocyane, nämlich solche, welche gleichzeitig die Eigenschaft von Farbstoffen haben „Tanno-Anthocyane", läßt sich mit Formalin fällen und gibt dann noch die Reaktionen der Gerbstoffe, so die mit Eisen (s. S. 377)[3]).

Nachweis von Anthocyan nach Nikiforowsky[4]).

Man zerreibt ein wenig Blüten mit wenig 50proz. Weingeist. Setzt man zu 1—1½ ccm eines solchen Extrakts sofort 2—3 Tropfen einer wässerigen (0,5—5 %) Lösung von Aluminiumchlorid, so tritt eine blaue oder rote Färbung ein. Man kann auch mit Formalin unter Zusatz von ein wenig Weingeist extrahieren, muß dann aber mehr Reagens nehmen.

Besonders saure Säfte muß man vorher neutralisieren (auch schwach alkalische).

K. Schwarz[5]) suchte Anthocyan durch Fällung mit Komplexsalzen zu isolieren.

Anthrachinon- und Anthranolglykoside

Die Anthracenderivate kommen in den Zellen überwiegend in glykosidischer Bindung vor. In den Pflanzen kommen in der Regel mehrere dieser Glykoside

[1]) R. Combes, Untersuchungen über die Bildung der Anthocyanfarbstoffe, Compt. rend., 1911, CLIII, S. 886.

[2]) Näheres bei H. Molisch, Notiz über eine blaue Diatomee, Ber. d. bot. Ges., 1903, XXI, S. 23.

[3]) A. Fietz, Formalin als Fixierungsmittel in der botanischen Mikrotechnik, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1922, XXXIX, S. 193 u. 1925, XLII, S. 257.

[4]) P. M. Nikiforowsky, Zur Kenntnis der Anthocyane, Zeitschr. physiol. Chem., 1925, CXLVI, S. 91.

[5]) K. Schwarz, Beitrag zur Kenntnis der Blütenfarbstoffe, Diss. Zürich. 1929.

zusammen vor. Anthrachinonderivate (Emodine, Chrysophanol u. a.) treten in getrockneten Pflanzenteilen (Drogen) zum Teil auch frei auf und begleiten Anthraglykoside. Für einige Familien sind diese Glykoside typisch (Polygonaceen, Rhamnaceen, Leguminosen, Rubiaceen und Flechten). In den Gattungen Aloë, Cassia und Rhamnus hat sich die An- oder Abwesenheit von Anthrachinonderivaten als ein Merkmal von systematischer Bedeutung erwiesen. Gehaltsbestimmungen sind meist nur für praktische Zwecke an Drogen ausgeführt worden. Bei Rhamnus frangula ist der Gehalt in Rinden (nach kolorimetrisch-kapillaranalytischen Vergleichsbestimmungen, ausgeführt an 2 cm dicken dreijährigen Zweigen von Sträuchern des gleichen Standortes) im August am niedrigsten (0,8 %), im Februar-März am höchsten (1,72 %), und fällt beim Austreiben (Tunmann[1])), so daß die Glykoside von Rhamnus mit dem Stoffwechselprozeß im Zusammenhang stehen und wahrscheinlich Reservestoffe darstellen.

Der mikrochemische Nachweis der Anthraglykoside gelingt derzeit nur mit Gruppenreagentien, Spezialreaktionen fehlen noch. Zum Nachweis dienen Alkalien, Ammoniakdämpfe und die Sublimation.

Mit Hilfe von Alkalien (Kalilauge, am besten weingeistige, Ammoniak, Kalkwasser, Alkalikarbonate) ist die Lokalisation nur dann einigermaßen sicher zu erkennen, wenn man die Schnitte direkt in das Reagens einträgt und sofort beobachtet. Es entstehen violette und rötliche Farben. Nach einiger Zeit verteilt sich der Farbstoff über das ganze Präparat. Der Ausfall der Reaktion hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die Konzentration der Lösungen ist nicht ohne Bedeutung. In den vegetativen Teilen von Rheum wird man mit einer konzentrierteren Lösung besser fahren, in Wurzeln und Samen, auch in Drogen sind schwächere Reagentien (Kalkwasser) vorzuziehen. Allgemein gültige Vorschriften über die Stärke der Reagentien lassen sich nicht geben. Die Reaktion steht nicht nur im Zusammenhang mit der größeren oder geringeren Menge der Glykoside, sondern auch mit der Art ihrer Bindung. Bei Drogen und getrockneten Pflanzen sind die Färbungen stärker; sie treten auch schneller ein. Dies hat seinen Grund darin, daß die in der Zelle vorkommenden Anthraglykoside sich beim Trocknen der Pflanzen leicht zersetzen und daß weiterhin Aglykone frei werden. Letztere geben bereits mit schwachen Alkalien eine Färbung.

Da die Reaktionen mit Alkalien nicht gut lokalisiert sind, ist es vorteilhafter, Ammoniakdampf anzuwenden. Souèges legt in eine Petrischale ein Uhrglas mit der Wölbung nach oben, gibt soviel wässerige Ammoniakflüssigkeit hinein, daß der Boden der Schale bedeckt ist, legt auf das Uhrglas den Objektträger mit den Schnitten und bedeckt das Ganze mit der oberen Hälfte der Petrischale. In 2—3 Minuten ist

[1]) O. Tunmann, Zur Kenntnis des Faulbaums und seiner Glykoside, Pharm. Zentralh., 1907, XLVIII, S. 99.

die Reaktion, die durch Erwärmen beschleunigt wird, vollzogen. Die Präparate werden in Paraffinöl untersucht. Souèges[1]) will seine Methode allgemein angewandt wissen. Hierzu ist zu bemerken, daß in den Fällen, in denen die Dämpfe kristallinische Niederschläge erzeugen sollen, die in Wasser löslich sind, ein hoher Exsikkator (Barth, S. 20) vorzuziehen ist. In den Petrischalen tritt leicht Wasser mit über. Auch sind bei der Dampfmethode die Befunde oft nicht klar (Rheum-Früchte). Liegen nämlich die Anthraglykoside zusammen mit Gerbstoffen vor, dann entstehen nur braune Färbungen. In solchen Fällen ist eine Kontrolle mit starker Lauge erforderlich. Überdies stehen die Reaktionen bei allen von Tunmann untersuchten Objekten an Schärfe der Mikrosublimation nach.

Die Sublimation der Anthrachinone (die Emodine gehen bereits bei 140⁰ über) direkt aus dem Pulver der Anthrachinondrogen wurde von Mitlacher[2]) eingeführt (bei Benutzung von Uhrgläsern, S. 31) und erprobt an: Cortex Frangulae (Nadeln und Schollen), Rad. Rhei (Nadeln und strukturlose Massen), Cortex Rhamni purshianae („große strahlig kristallinisch erstarrte gelbe Massen“) und Folia Sennae („kugelig erstarrte kristallinische Massen“, die erst bei Resublimation Nadeln geben). Die Sublimate lösen sich in Weingeist, Chloroform, Äther, Toluol und Eisessig, in weingeistiger Kalilauge (kirschrot), wässeriger Kalilauge (rot), Soda (rötlichbraun). Ammoniak färbt schwach rot. Bei der Sublimation auf der Asbestplatte (höhere Temperatur) erhält man aus Senna — wenn auch nicht immer — Nadeln; bei niedriger Temperatur lassen sich (Rheum) feine Nadeln (15—20 μ) erzielen, die völlig farblos sind (durchfallendes Licht). Welche Körper in den Sublimaten vorliegen, ist noch unbekannt, da sicheres Vergleichsmaterial nicht zur Verfügung steht. Mit Kalilauge hat Tunmann nur eine unbeständige Verbindung in Wetzsteinform erhalten (s. Physcion). Gut eignet sich als Reagens für die Sublimate die hochkonzentrierte weingeistige Kalilauge, die die Kristalle zuerst violett färbt und sie später löst.

Nach Tunmann sind in den Sublimaten zwei verschiedene Anthrachinone zugegen, ein in Soda löslicher und ein in Soda unlöslicher

[1]) R. Souèges, Anwendung gasförmiger Reagentien zur Charakterisierung der wirksamen Drogenbestandteile, Bull. scienc. pharm., 1911, XVIII, S. 526. Das Verfahren von Souèges kann dahin erweitert werden, daß man nur einen Teil der Schnitte in Öl betrachtet, den andern in Salzsäure legt. Es muß dann in dem durch Ammoniak geröteten Zellinhalt in wenigen Augenblicken eine körnige bis feinkristallinische chromgelbe Fällung entstehen (Tunmann).

[2]) W. Mitlacher, Zur Mikrochemie einiger Emodindrogen, Pharm. Praxis, 1906, V, Nr. 11; Pharmaz. Post, 1906, XXXIX, S. 721.

Körper. Die „Klumpen" oder „Schollen" bestehen nicht aus der gleichen Substanz wie die Nadeln; sie geben bei höherer Temperatur nur Sphärite, niemals Nadeln, wie Fig. 15 (S. 39) zeigt. Es muß jedoch betont werden, daß nicht sämtliche Anthraglykosid-Drogen kristallinische Sublimate geben. Bei Rhamnus cathartica hat Tunmann weder bei niederer noch bei höherer Temperatur, (auch nicht bei Resublimation) Kristalle erhalten, sondern nur amorphe gelbe Massen, die scharfe Reaktionen mit Alkalien gaben.

Schwefelsäure wird man nur beiläufig zum Nachweis anwenden; sie bewirkt eine kräftige (rote) Farbenreaktion, steht aber den Alkalien insofern nach, weil eine ziemlich konz. Säure benutzt werden muß, die das Gewebe rasch zerstört. Bei Rhamnus frangula darf nach O. Linde (Apoth.-Ztg., 1905, S. 460) die konz. Säure höchstens mit 10 % Wasser gemischt sein, schwächere Säuren geben keine Reaktionen mehr.

Bei der Rinde von Rhamnus carniolica kommt es in den Sublimaten zur Bildung von ungemein breiten und langen Kristallen, wie man solche bei Rh. cathartica niemals, bei Rh. frangula nur sehr selten erhält. Diese Kristalle haben eine chromgelbe Färbung (bei durchfallendem Lichte) und eine gerade Auslöschung (Tunmann).

Mikrosublimation von Kap-Aloë gibt, wenn auf der Asbestplatte ausgeführt, ein amorphes, braunes, in Lauge sich braun lösendes Sublimat; im Vakuum-Sublimat kann man auch mit dem Polarisations-Mikroskop nur vereinzelte kristallinische Partikelchen erkennen.

Münkner[1]) erhielt bei einigen Aloë-Arten aus fein zerkleinertem Blattmaterial ein deutlich kristallisiertes Sublimat. Die Kristalle bestanden aus kleinen Nadeln, die meist einzeln lagen. Sie lösten sich in weingeistiger Kalilauge mit kirschroter Farbe. In anderen Fällen, z. B. bei Aloë Salm-Dyckiana bestand das Sublimat aus gelben Tröpfchen, die allmählich erstarrten und dann eine strahlige kristallinische Struktur aufwiesen. Sie waren mit roter Farbe in weingeistiger Kalilauge löslich. Die Bergersche Einteilung der Gattung Aloe wurde im wesentlichen durch die Ergebnisse der chemischen Untersuchung gestützt.

Für die Identifizierung der durch Vakuum-Sublimation erhaltenen Sublimate aus Anthrachinondrogen hat Rosenthaler[2]) folgenden Gang angegeben:

[1]) H. Münkner, Das Vorkommen und Fehlen des Emodins bei den Arten der Gattung Aloë im Hinblick auf ihre Systematik, Beiträge z. Biolog. d. Pflanzen, 1928, XVI, S. 217.

[2]) L. Rosenthaler, Pyroanalyse der Drogen, II. Ber. deutsch. pharmazeut. Ges., 1912, XXII, S. 525.

Die Sublimate zeigen als Grundfarbe braun oder gelb und geben mit Lauge die typische Purpurfärbung der Oxymethylanthrachinone.

A. In den Sublimaten treten isoliert liegende Nadeln auf:
  I. Außerdem skelettartige Gebilde und Scheiben: die weingeistige Lösung gibt mit Ferrichlorid braunrote Färbung . . . . Rhiz. rhei rhapont.
  II. Keine Skelette und Scheibchen:
    a) Weingeistige Lösung mit Ferrichlorid grün . Folia Sennae.
    b) Weingeistige Lösung mit Ferrichlorid braunrot . . . . Rhiz. rhei.

B. Sublimat ohne isoliert liegende Nadeln:
  I. Substanz schmilzt beim Erhitzen. . . . . . . Chrysarobinum[1])
  II. Substanz schmilzt nicht beim Erhitzen:
    a) Das Sublimat enthält Säulchen, die zum Teil verwachsen sind und dann Winkel von 45° oder 90° miteinander bilden. Weingeistige Lösung mit Ferrichlorid bleibend grün . . Cortex frangulae
    b) Sublimiert ohne solche Säulchen:
      α) Amorphe Schollen voll dünner Nädelchen. Weingeistige Lösung mit Ferrichlorid vorübergehend grün, dann braun . . . . . Cortex cascarae sagradae
      β) Keine Schollen mit Nädelchen. Weingeistige Lösung mit Ferrichlorid braunrot Radix Canaigre

Weniger Bedeutung hat der von Tunmann herrührende Vorschlag, die Oxymethylanthrachinone durch Nitrierung nachzuweisen. Kocht man einen Schnitt durch Rhabarber unter dem Deckglas mit konzentrierter Salpetersäure, dann bilden sich nach dem Abkühlen zuweilen erst nach mehreren Stunden zahlreiche bräunlich-gelbe einzeln liegende Nadeln und Büschel — nach Tunmann Nitro-Oxymethylanthrachinone — die sich teils auf dem Schnitt, teils am Deckglasrande abscheiden. Dieselben Kristalle erhält man aus den Sublimaten.

Ein weiteres Verfahren, Oxymethylanthrachinone nachzuweisen, besteht darin, daß man Schnitte oder Pulver auf dem Objektträger unter dem Deckglas mit Essigäther auszieht. Man erhält so aus der Rinde von Rhamnus carniolica sofort (innerhalb einer Minute) zahlreiche einzeln liegende Nadeln, dann Nadeln in Form von Garben, Büscheln, Ähren, Pinseln und Doppelpinseln. Sie sind 100—300 μ groß, anfangs überwiegend rotbraun gefärbt, werden aber in einigen Stunden chromgelb und gehen zum Teil in Drusen über. In gleicher Weise erhält man Anthrachinonderivate aus der Rinde von Rhamnus cathartica. Bei Rhamnus frangula und Rhamnus purshiana ist Er-

[1]) Bei der Sublimation in seinem Apparat hat Jennrich aus Chrysarobin Nadeln erhalten (s. S. 581).

wärmen vorteilhaft. Bei Frangula sind dann die am Deckglasrande sich ausscheidenden Massen und Tropfen fast rotgelb, die wenigen Kristalle bilden sich in Drusenform und erst nach mehreren Stunden; auch bei Rh. purshiana ergibt die — recht träge — Kristallbildung Drusen (Tunmann)[1].

Nach Kofler[2]) geht man in folgender Weise vor: Eine kleine Menge des Drogenpulvers wird auf dem Objektträger mit konzentrierter Salzsäure befeuchtet, mit einem Deckglas bedeckt und über dem Mikrobrenner erwärmt. Dann wird rasch eine reichliche Menge einer Mischung gleicher Teile von Essigäther und Tetrachloräthan zugesetzt, und zwar so viel, daß nicht nur der Raum zwischen Deckglas und Objektträger ausgefüllt ist, sondern Flüssigkeit sich auch noch außerhalb des Deckglasrandes befindet. Zwecks besserer Mischung wird das Deckglas mit Hilfe zweier Nadeln ein- bis mehrmals seitlich aufgehoben und nochmals erwärmt. Nach 5—10 Minuten, wenn die Flüssigkeit außerhalb des Deckglases vollständig verdunstet ist, erhält man — am schönsten bei Rheum, nicht bei Senna — Nadeln und andere Kristalle.

Fig. 137. Kristalle aus Rhabarber mit weingeistigem Ammoniak

Rosenthaler erhielt Kristalle (Fig. 137), als er Rhabarberpulver mit weingeistigem Ammoniak auszog. Siehe ferner G. Moßler, Über den Nachweis von Aloë in Gemischen mit Auszügen oxymethylanthrachinonhältiger Drogen und die Erkennung letzterer durch die Kristallform der isolierten Oxymethylanthrachinone. Pharmaz. Post, 1913, XLVI, S. 325.

Über die Lokalisation innerhalb der Zelle sprach sich zuerst Borscow[3]) aus; er vertrat die Ansicht, daß Frangulin in Rhamnus frangula an kleine Stärkekörner gebunden sei. Nach Tschirch[4]) ist, „wie es scheint, auch die Chrysophansäure des Rhabarberrhizoms und das Rhamnoxanthin der Frangularinde an Plastiden“ gebunden. Beide

[1]) O. Tunmann, l. c. S. 568, Anmerkung 1.

[2]) L. Kofler, Die Anwendung mikrochemischer Methoden zur Prüfung der Arzneimittel. IV. Die Anthrachinondrogen, Zeitschr. allg. österr. Apoth.-Ver., 1918, LVI, S. 231.

[3]) El. Borscow, Beiträge zur Histochemie der Pflanzen, Bot. Ztg., 1874, XXXII, S. 17.

[4]) A. Tschirch, Angew. Pflanzenanatomie, 1889, S. 63.

Autoren verlegen somit den Sitz in organisierte Bestandteile der Zelle. Doch schon vorher deutet Herrmann[1]) „einen feinkörnigen, gelblichen Inhalt" in den parenchymatischen Zellen bei Rumex crispus als Chrysophansäure, bemerkt aber, daß sich in anderen Zellen „ein flüssiger, blaßgelber bis orangefarbener Inhalt" findet, der die gleichen Reaktionen gibt. Diese blaßgelbe Färbung der Zellinhalte soll auf Einwirkung der Alkalien des Plasmas auf gelöste Chrysophansäure beruhen und Borscow führt die rötliche Färbung mancher Membranen in den Zweigen und Stämmen von Frangula auf ähnliche Vorgänge zurück. Eine Speicherung der Anthracenderivate in den Zellwänden hat Tunmann mit Sicherheit nicht feststellen können, sie erscheint nicht wahrscheinlich. Im allgemeinen sind die Anthraglykoside und die sie begleitenden freien Anthracenderivate im Zellsaft gelöst. Bei Rheum-Arten, Frangula u. a. bedingen sie die blaßgelbe Färbung des Zellsaftes. Doch wird man unschwer beobachten, daß die Färbung bei längerem Liegen der Präparate in Wasser stärker wird und daß völlig farblose Zellen ebenfalls, wenn auch schwächer als die gelben, auf Oxymethylanthrachinone reagieren. Wo die Glykoside in reichlicher Menge oder in gerbstoffartiger Bindung auftreten, da erscheint der Zellsaft dickflüssig und von dunkler Färbung. Bessere Erfolge gibt die Plasmolyse (3 Minuten lang) mit 4—5proz. Salpeter- oder Chlornatriumlösung (Goris und Crété). In außer Funktion gesetzten Geweben kommt es zur Klumpenbildung im Zellumen.

Auf „Frangulin" ging Borscow bei Rhamnus frangula und Herrmann bei Rh. cathartica ein. In Rh. cathartica fallen die Reaktionen sehr schwach aus, die karminrote Färbung nimmt in kurzer Zeit einen braunen Farbenton an. Am reichlichsten treten die Glykoside in den Markstrahlen auf, weniger in dem dünnwandigen Bast- und Rindenparenchym. In Rh. frangula wurden die Anthrachinone von Tunmann (a. a. O.) verfolgt; sie sind im Mesophyll der Blätter mit Sicherheit nicht nachweisbar (individuelle Schwankungen, schnelle Ableitung?), erst im Leitparenchym der Blattnerven; im Blattstiel: in den Markstrahlen und in den äußeren Elementen des Siebteiles; in jungen Zweigspitzen: im Siebteil, im Parenchym um die Schleimbehälter und selbst in den jugendlichen, noch unverdickten primären Bastfasern, aus denen sie aber bald verschwinden; in der Droge: in der sekundären Rinde, im Parenchym (Phloem, Markstrahlen), ebenso in der Wurzel. Die Korkzellen von Rhamnus frangula, purshiana, cathartica und carniolica sind nach Tunmann frei von Anthrachinonderivaten.

[1]) O. Herrmann, Nachweis einiger organischer Verbindungen in den vegetabilischen Geweben, Dissertation, Leipzig, 1876.

Grès[1]), der sich hauptsächlich der Kalilauge und der konzentrierten Schwefelsäure bedient, macht über das Vorkommen der Oxymethylanthrachinone bei den Rhamnaceen folgende Angaben:

Stengel von Rhamnus frangula. Im Mai treten die Reaktionen in allen Markstrahlzellen ein, ferner in den Siebteilen und in den „tiefen“ Regionen der Rinde, nicht — entgegen Borscow — im Holzparenchym. Im August gibt Kalilauge nur noch eine schwache Rotfärbung, die Schwefelsäurereaktion ist zweifelhaft.

Stengel von Rhamnus infectoria. Rotfärbung mit Kalilauge in dem das Mark berührenden Streifen von Holzparenchym und in den „tiefen“ Teilen der Markstrahlen, sie wird um so schwächer, je näher die Markstrahlen dem Kambium liegen. Im Siebteil werden einige Zellen gelbrot. In einem im Mai gesammelten Stengel beobachtete er starke Reaktionen in den äußeren Teilen der Siebteile und den benachbarten Zonen der Rinde, im nicht verholzten Holzparenchym und im äußeren Mark.

Stengel von Rhamnus cathartica. Starke (aber weniger stark als bei den beiden vorhergehenden) Reaktion in der Siebteilzone, den Markstrahlen und den in der Nähe des Pericykels gelegenen Teilen der Rinde, in dem im Mai gesammelten Stengel. Im August gibt Lauge an den erwähnten Stellen noch eine Gelbfärbung, Schwefelsäure keine nachweisbare Reaktion.

Ähnlich wie in den vorhergehenden Arten liegen die Verhältnisse in den Stengeln von Rhamnus alaternus, caroliniana, pumila, chlorophora, Billiardii und Purshiana.

Die Reaktionen verliefen negativ in den frischen Stengeln von Rhamnus rhodopoea, und Pallasii, Paliurus australis und aculeatus, Ceanothus americanus und africanus, Zizyphus vulgaris und Spina Christi, Pomaderris aspera und racemosa, Colletia ferox, cruciata, spinosa.

Blätter: Bei Rhamnus frangula, infectoria, cathartica, alaternus und Billiardii befinden sich die Glykoside in den Nerven in ähnlicher Verteilung wie in den Stengeln, am meisten ist in den Markstrahlen, am wenigsten in den Siebteilen.

Wurzeln: Bei Rhamnus frangula, cathartica, alaternus und infectoria finden sich die Glykoside in den Parenchymzellen, mit einem Maximum im Rindenparenchym[2]).

---

[1]) L. Grès, Contribution á l'étude anatomique et microchimique des Rhamnées, Thèse Doct. Paris (Pharmacie), 1901.

[2]) O. Tunmann, Über Frangula-Ersatz, die Rinden von Rhamnus carniolica A. Kerner und Alnus glutinosa Gaertn., Schweiz. Apoth.-Ztg. 1915, LIII, S. 313.

„Chrysophansäure" verfolgte Borscow in Rumex obtusifolius und Physcia parietina und Herrmann in Rumex crispus und Squamaria elegans. Im Rhizom von Polygonum cuspidatum findet sich Polygonin (Emodinglykosid) im Bastparenchym, Markstrahlen und peripherem Mark, nicht in den Phloem- und Holzstrahlen (mit stark verdünnter Kalilauge, Goris und Crété)[1]. In den Sennesblättern (Droge) treten die Reaktionen nur im zentralen Mesophyll ein, nicht in den Palisaden und in der Epidermis (Souèges). Bei Rheum ist die Lokalisation im Rhizom ohne weiteres ersichtlich (niemals in der Membran). In den Früchten von Rheum palmatum tanguticum fand Dye[2]) die Anthrachinone in der Samenschale, weniger in der Fruchtschale. Die gleiche Lokalisation fanden H. Miller und Tunmann in Rh. rhaponticum, hybridum, undulatum, compactum, emodi, leucorrhizum u. a.; sowie bei Polygonum cuspidatum. In der Fruchtschale finden sie sich nur in der innersten Schicht (Fig. 138). Im Stengel, Blattstiel und Blattnerv von Rheum sehen wir Glykoside in vereinzelten Zellen des Markes und der Rinde und in subepidermalen Zellen.

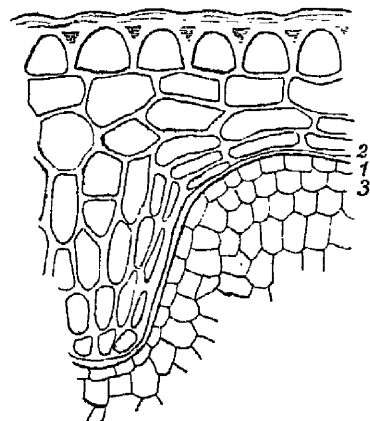



Fig. 138. Rheum undulatum (Frucht, Querschnitt). Schicht 1 (Samenschale) führt die Anthraglykoside, die innerste Schicht der Fruchtschale, 2, führt Spuren, die auch in Schicht 3 zuweilen auftreten (Tunmann)

Die Lokalisation des Polygonins, eines neben Polydatosid in den unterirdischen Organen von Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc. vorkommenden Glykosids, wurde von Goris und Crété[1]) studiert. Sie legten die Schnitte in 5proz. Kochsalz- oder Salpeterlösung und gaben dann nach Eintreten der Plasmolyse von der Seite 0,5proz. Kalilauge dazu, worauf in den glykosidhaltigen Zellen die bekannte Rotfärbung eintrat. Sie fanden das Glykosid in Wurzel und Rhizom in allen Parenchymzellen, auch in den Markstrahlen und den äußeren Teilen des Marks. Sie stehen in Reihen übereinander. Die Glykosidzellen enthalten außerdem Gerbstoff.

Man kann mit demselben Verfahren nachweisen, daß die Anthraglykoside des Rhabarberrhizoms ihren Sitz ebenfalls in den Parenchymzellen, besonders den Markstrahlen haben und daß die Glykosidzellen auch hier Gerbstoffe führen. Auch in der Wurzel von Rumex obtusifolius L., in der ein Chrysophanol-Glykosid vorkommt, führt das Ver-

[1]) A. Goris et L. Crété, Sur la valeur purgative du Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc., Bull. scienc. pharm., 1907, XIV, S. 698.

[2]) C. A. Dye, Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen über die unterirdischen Organe von Valeriana, Rheum und Inula, Berner Dissert., 1901, S. 38.

fahren von Goris und Crété zu einem ähnlichen Ergebnis. Im Rindenparenchym der Hauptwurzel sind beträchtlich weniger Anthrachinonderivate vorhanden, als in dem einer jungen Seitenwurzel (Goris).

Bei der Beurteilung der im vorhergehenden mitgeteilten Ergebnisse über Nachweis und Verteilung der Anthrachinonglykoside darf nicht außer acht gelassenwerden, daß in der Pflanze primär wahrscheinlich nicht Anthrachinone und Anthrachinonglykoside, sondern deren Reduktionsprodukte die Anthranole und deren Glykoside gebildet werden.

Die Geschichte des mikrochemischen Nachweises dieser Stoffe beginnt 1915 mit Untersuchungen von Tunmann[1]) und Wasicky[2]). Tunmann erhielt durch Sublimation des Holzes von Andira araroba zwei verschiedene Anthranole und wandte zu deren Nachweis als erster das Meckesche Reagens (Schwefelsäure + selenige Säure) an. Während die Anthrachinonsublimate mit dem Meckeschen Reagens gelbrot und kirschrot wurden, erhielt er mit den Anthranolsublimaten nur für einen Augenblick eine rote Färbung, die aber sofort in Blaugrau übergeht und bald blauschwarz wird; nach 12 Stunden erscheint der Tropfen makroskopisch schwarz (mikroskopisch blauschwarz) lackartig. Tunmann stellte gelegentlich dieser Untersuchung fest, daß die Holzparenchymzellen von Andira araroba im jüngeren Gewebe mit einer hochgesättigten Lösung von Anthranolen derartig erfüllt sind, daß ihnen die dünnen Membranstellen (Tüpfel) der benachbarten Gefäße besonders beim Absterben der Zellen nicht standzuhalten vermögen. Die Anthranole treten infolgedessen in die Gefäße und die Fasertracheiden über.

Ungefähr gleichzeitig hatte Wasicky festgestellt, daß die Rhabarberpflanze im ersten Frühjahr nicht die durch Rotfärbung mit Kalilauge nachweisbaren Anthrachinonderivate besitzt, sondern daß diese erst mit dem Fortschreiten der Jahreszeit auftreten, was mit dem Fluoreszenzmikroskop leicht nachzuweisen war.

[1]) O. Tunmann, Über die Bildung der Araroba (des Roh-Chrysarobins) in Andira araroba Aguiar, Apoth.-Ztg., 1915, XXX, S. 517.

[2]) R. Wasicky, Zur Mikrochemie der Oxymethylanthrachinone und über ein Anthraglukoside spaltendes Enzym im Rhabarber, Ber. deutsch. bot. Ges., 1915, XXXIII, S. 37. In dieser Abhandlung teilt Wasicky u. a. mit, daß von in Boraxglyzerin (1 : 10) liegenden Rhabarberschnitten bei Betrachtung mit dem Fluoreszenzmikrosokp grüne Schleier ausgehen, die von den in Lösung gehenden Oxymethylanthrachinonglykosiden herrühren und daß man in Schnitten von Rhabarber oder Canaigre, die in verdünntem Glyzerin liegen, mit Rheum-Enzym in wenigen Minuten zahlreiche Kristalle erhält, die die Oxymethylanthrachinon-Reaktion geben.

Tunmann[1]) stellte dann weiter fest, daß in „Einschlüssen" des Rhabarberrhizoms, d. h. in Gewebekomplexen, die durch Kork von dem umgebenden Gewebe abgeschlossen werden, eine Rückbildung der Oxymethylanthrachinone in Anthranole erfolgt. Auch konnte er die Befunde von Waliaschko und Krassowski über das Vorkommen eines Emodinanthranols in den Früchten von Rhamnus cathartica auf mikrochemischem Wege bestätigen.

Wasicky und Heinz[2]) zeigten dann weiter, daß frisch gegrabener Rhabarber weder im Frühjahr noch im Herbst ein Sublimat lieferte, wie dies auch schon länger von frischer Frangularinde bekannt ist, daß man aber Sublimate — infolge Spaltung der vorhandenen Glykoside — erhält, wenn man den Schnitt vor der Sublimation mit verdünnter Schwefelsäure betupft. „Zu verschiedenen Jahreszeiten mit der Wurzel vorgenommene Untersuchungen zeigten, daß, wenn die Kalilaugenreaktion stark positiv ausfällt, reichlich Anthrachinonsublimate zu erhalten sind; dagegen überwiegen die Anthranolderivate in um so höherem Grade, je mehr die rote Farbenreaktion mit Alkali ausbleibt." Letztere kann hervorgerufen werden, wenn man noch Wasserstoffperoxyd hinzufügt. Auch in der Handelsware des Rhabarbers konnten in einigen Fällen Anthranole nachgewiesen werden. Wasicky und Heinz schließen aus ihren Versuchen, daß in der Rhabarberpflanze weder freie Anthrachinone noch Anthranole vorhanden sind und daß sie in den Wintermonaten an Stelle von Anthrachinonen Anthranolderivate bildet, im Gegensatz zu Rhamnus frangula, wo in der lebenden Pflanze das ganze Jahr hindurch Anthranolderivate auftreten. In Bestätigung dieser Versuche konnte dann noch Tukats[3]) nachweisen, daß Rhabarberrhizome, die im Winter bei großer Kälte geerntet waren, Chrysophanolanthranol (F. 202—203°) enthielten.

Aloine

Die meisten der die Handelsaloë liefernden Aloë-Arten enthalten ein Gemisch von Barbaloin und Isobarbaloin; in der Natal-Aloë (von Aloë candelabrum Berger) findet sich ein Gemisch von Nataloin und Homonataloin.

Zum mikrochemischen Nachweis eignet sich besonders das Isobarbaloin, das mit einer Anzahl von Oxydationsmitteln eine Rotfärbung gibt. Auch die Eigen-

[1]) O. Tunmann, Über „Einschlüsse" im Rhizom von Rheum, zugleich ein Beitrag zur Mikrochemie der Oxymethylanthrachinone führenden Pflanzen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1917, XXXV, S. 191.

[2]) R. Wasicky u. B. Heinz, Ein Beitrag zur Kenntnis der Verbindungen, welche die Abführwirkung des Rhabarbers bedingen, Pharmaz. Monatshefte, 1924, Nr. 12.

[3]) A. Tukats, Ein Beitrag zur Kenntnis der Anthranole im Rhabarber, Pharmaz. Monatshefte, 1925, V.

schaft der Aloine, von Phosphorwolframsäure und Silikowolframsäure gefällt zu werden, ist erwähnenswert.

Nach Macqret[1]) findet sich das Aloin nur in den großen Zellen des Pericykels der Blattbündel und nicht in den kleinen Endodermiszellen. Letztere enthalten nur Gerbstoffkugeln. Trägt man Blattstücke auf einige Tage in eine 10proz. mit einigen Tropfen Schwefelsäure versetzte Kaliumdichromatlösung ein, dann erscheinen nur die Zellen des Pericykels violett gefärbt. Der Inhalt des Pericykels löst sich ebenso wie die Handelsaloe in Weingeist. Molisch[2]) bringt das Aloin dadurch zur Kristallisation, daß er einen Safttropfen auf dem Objektträger mit etwas Glyzerin mischt und unter Deckglas einige Tage beläßt. Es entstehen Sphärite, die sich in Salpetersäure mit tiefroter, in Kalilauge und Ammoniak mit braungelber Farbe lösen; die Färbung geht bei Luftzutritt in Rot über. Bromdämpfe färben die feuchten Kristalle kirschrot. Oxydationsmittel (1proz. Chromsäure, Jod, Chlorkalk, verdünntes Ferrichlorid) färben den ausgeflossenen Saft und den in den Präparaten rot. Es muß aber bemerkt werden, daß der Aloingehalt unserer Gewächshauspflanzen sehr zu schwanken scheint. Bei bis 50 cm langen Blättern (A. arborescens) entstand mit Oxydationsmitteln nur ein bräunliches Gerinnsel, keine rote Färbung. Mit Glyzerin gelang eine Kristallisation mit verschiedenen Aloëarten nicht; es trat nach 3—5 Tagen nur schwache Braunfärbung ein. Bei der Sublimation von Blättern, die makrochemisch bei Verarbeitung von 3 g Substanz die Borntraegersche Reaktion gaben, wurden nur geringe, amorphe, gelbliche Massen erzielt, die schwache Reaktionen geben. Über Mikrosublimation von Aloë s. S. 570.

Morindaglykoside

Das Glykosid Morindin (in Morinda citrifolia Rubiacee, Perkin, Hummel, Oesterle, Tisza) ist unlöslich in Äther, Chloroform, Weingeist, Petroläther, sehr leicht löslich in Azeton, Eisessig, Essigsäureanhydrid und löst sich in Alkalien und in konz. Schwefelsäure mit roter Farbe. Beginnt im Kapillarröhrchen bei 235° zu sublimieren und schmilzt bei 245°. Es spaltet sich bei der Hydrolyse in Zucker und Morindon (ein Trioxymethylanthrachinon), welches sich in Alkalien und konz. Schwefelsäure blauviolett löst. Ferner sind in der Wurzelrinde zwei Dioxymethylanthrachinone gefunden worden; Morindadiol, löst sich in Alkalien orangefarben, in Schwefelsäure kirschrot, Soranjidiol löst sich in Alkalien blauviolett, die Schwefelsäurelösung ist anfangs kirschrot, wird bald violett.

[1]) M. G. Macqret, Le tissu sécréteur des Aloès, Journ. de Botan., 1888, II, S. 379 u. Prollius, Arch. d. Pharm., 1884, CCXXII, S. 553.

[2]) H. Molisch, Studien über den Milchsaft und Schleimsaft der Pflanzen, Jena 1901.

Präparate der Wurzelrinde von Morinda citrifolia werden durch Alkalien oder Schwefelsäure dunkelrot und rote Streifen fließen ab[1]). Erwärmt man die Schnitte längere Zeit mit Kalilauge, so schlägt die rote Farbe in den Markstrahlen in Blau um, Morindonabspaltung. Die Morindinreaktion tritt in den Markstrahlen auch ein, wenn man aus den Präparaten Soranjidiol mit Äther, Morindadiol mit absolutem Alkohol entfernt hat. Präparate, denen Soranjidiol mit Chloroform, Morindin mit warmem Wasser entzogen ist, zeigen in den Geleitzellen Morindadiol durch orangegelbe Kalilaugefärbung an. Präparate, die wiederholt unter Deckglas mit Kalilauge ausgewaschen wurden (in der Kälte), zeigen bei nachfolgendem Erwärmen mit Kalilauge im Phloemparenchym eine geringe blaue Fällung, Soranjidiol. Morindin ist somit vorzugsweise in den Markstrahlen, Morindadiol in den Geleitzellen, Soranjidiol im Phloemparenchym lokalisiert. Auch der Steinkork enthält Oxymethylanthrachinone. Im Mikrosublimat gelang die Trennung der Körper nicht.

Rubiaglykoside

Ruberythrinsäure bildet seidenglänzende gelbe Nadeln (F. 258—260°), die bei der Spaltung mit verd. Salzsäure Glykose und Alizarin (1-2-Dioxyanthrachinon) liefern. Ruberythrinsäure ist das Hauptglykosid in Rubia tinctorum (Wurzel) und wird begleitet von Purpuringlykosid (sehr unbeständig, zerfällt in Glykose und Purpurin, 1-2-4-Trioxyanthrachinon, organgegelbe Nadeln) und Rubiadinglykosid (zerfällt in Glykose und Rubiadin, wahrscheinlich ein Homologes des Purpuroxanthins, gelbglänzende Nadeln).

Die Glykoside kommen in der Wurzel von Rubia tinctorum (Krappwurzel) im Zellsaft (Rinden- und Markparenchym, nicht in den Raphidenzellen) gelöst vor, dem sie eine gelbe Färbung verleihen. Die Lokalisation ist ohne weiteres in jedem Wasserpräparate zu erkennen. Naegeli und Schwendener[2]) geben an, daß bei alten Wurzeln auch die Membranen noch lebensfähiger Zellen die Glykoside führen; wahrscheinlich beruht die Speicherung auf einer Abtötung der Zellen durch zu starke Plasmolyse, die die Autoren bei ihrer Feststellung benutzten. An dem Berner Material waren die Membranen bei vorsichtiger Präparation stets farblos, die Membranspeicherung ist eine postmortale Erscheinung. Die Glykosidgemische geben mit Alkalien purpurrote, mit Säuren orangefarbene bis dunkelgelbe Farbenreaktionen; Ferrichlorid färbt rotbraun. Durch Auswaschen der Schnitte mit warmem Wasser

[1]) O. Tunmann, Z. Anatom. von Morinda citrifolia mit bes. Berücks. d. mikrochem. Verh., Pharm. Zentralh., 1908, XLIX, S. 1013.

[2]) C. Naegeli und S. Schwendener, Das Mikroskop, II. Aufl., 1877, S. 502.

läßt sich die Ruberythrinsäure zum großen Teil entfernen; die mit den ausgewaschenen Schnitten angestellten Reaktionen weisen auf die Nebenglykoside hin. Eine Lokalisation ist dann nicht mehr zu erkennen.

Chemineau[1]) verwendet zum Studium der Lokalisation die Plasmolyse, indem er die Schnitte 5—10 Minuten in eine 5proz. Kochsalzlösung bringt und sie in derselben Lösung betrachtet. Man sieht dann in den Zellen kleine goldgelbe Kügelchen, die sich mit sehr verdünnter Lauge orangerot färben. Legt man Schnitte in absoluten Alkohol, so treten im Verlauf einiger Minuten rötliche Massen auf, die im Verlauf einer Viertelstunde ein kristallinisches Aussehen annehmen. Es ist aber nicht sicher, ob es dich dabei um Ruberythrinsäure handelt.

Zu Lokalisationsstudien kann man ferner die Einwirkung gasförmigen Ammoniaks heranziehen, mit dem die Glykosidzellen sich rot färben. (Russell[2])).

Die Glykoside finden sich bei Rubia tinctorum L.:

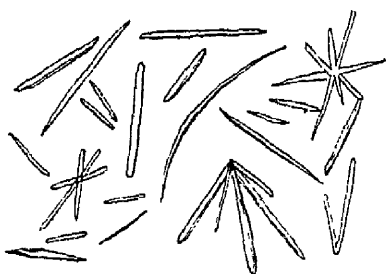



Fig. 139. Rubia tinctorum, Kristalle von Ruberythrinsäure i Mikrosublimat der Wurzel

In einem jungen Würzelchen. Im äußeren Rindenparenchym, in geringer Menge in der Endodermis, dem Pericykel, in einigen Parenchymzellen des Siebteils und vereinzelten des Holzes.

In älteren Würzelchen. Hauptsächlich im Phelloderm, einigen Zellen des Rindenparenchyms und des Siebteils, im Kambium und in einigen Zellen des Holzes.

Im Rhizom. In allen Parenchymgeweben, besonders im äußeren Teil des Phelloderms, dem Kambium, der Peripherie des Markes. Die Schuppen (ecailles), welche die Ausläufer führen, sind in ihren parenchymatischen Elementen mit Ruberythrinsäure vollgepropft. Stengel, Blätter, Blüte, Frucht und Samen enthalten keine Farbstoffglykoside.

Chemineau hat dann noch gezeigt, daß Feuchtigkeit und Dunkelheit zur Bildung der Farbstoffglykoside unbedingt nötig sind.

Die Verteilung der Farbstoffglykoside bei Rubia peregrina L. unterscheidet sich insofern von der bei Rubia tinctorum, daß sie bei ersterer in Holz und Mark vollständig fehlen (Goris).

[1]) R. Chemineau, Rech. microch. s. quelq. glukosid., Thèse 1903, Tours 1904, S. 33.

[2]) W. Russell, Recherches experimentales sur les principes actifs de la Garance, Rev. gén. de Bot., 1905, XVII, S. 254.

Bei der Sublimation[1]) eines kleinen Schnittes lebenden Materials der Krappwurzel erhält man farblose bis schwach gelbliche Nadeln (meist 15—20 μ lang), die einzeln oder zu kleinen Gruppen vereint liegen (Fig. 139). Konzentrierte Kalilauge färbt rot, bei Wasserzusatz tritt Lösung ein. Kaltes Wasser löst nicht. Da die Kristalle sich leicht in warmem Wasser lösen, so sind sie Ruberythrinsäure. Alizarin, das rote Nadeln bildet und sich in lange gelagerten Wurzeln abscheidet, läßt sich aus altem Material ebenfalls unmittelbar aus Schnitten heraussublimieren. Wurzeln, die erst einige Wochen an der Luft liegen, besitzen noch kein Alizarin.

Chrysarobin

Chrysarobin ist das Sekret aus den Höhlungen der Stämme von Andira araroba Aguiar. Nach Umkristallisieren aus Benzol ist es ein gelbes kristallinisches Pulver[2]), das sich fast völlig in etwa 300 Teilen siedendem Weingeist und 45 Teilen Chloroform von 40° löst. Das Chrysarobin ist ein Gemisch. Nachgewiesen sind: Chrysophansäureanthranol, Emodinanthranolmonomethyläther, Emodinmonomethyläther, Dehydroemodinanthranolmonomethyläther, Emodin (oder Emodinanthranol?)[3]). Chrysarobin enthält also kein Glykosid.

Chrysarobin löst sich in konzentrierter Schwefelsäure mit orangeroter, bei Gegenwart von seleniger Säure mit dunkelgrüner Farbe. Streut man ein Körnchen Chrysarobin in hochkonzentrierte weingeistige Kalilauge, so erfolgt zunächst Lösung mit rotbrauner Farbe; von außen her erfolgt dann Purpurfärbung, so daß in einem bestimmten Augenblick die innen noch rotbraune Lösung mit einer purpurfarbenen Zone umgeben ist.

Durch Vakuumsublimation erhielt Rosenthaler[4]) orangerote Täfelchen und besonders zwischen gekreuzten Nicols wahrnehmbare skelettartige Gebilde. Dieselben Gebilde erhielt Jennrich (l. c. S. 37) auf seiner Sublimationsplatte bei 300°. Bei niedereren Temperaturen erhielt Jennrich andere Kristalle:

160°: Neben gelben Nadeln, die zuweilen übereinander gelagert sind, oder Sterne bilden, warzenförmige Aggregate, oft mit kleinen Nadeln besetzt, außerdem meist unregelmäßig quadratische Blättchen.

200°: Gelbbraune Kristallwarzen und langgestreckte Blättchen.

240°: Neben Warzen kanariengelbe unregelmäßige Blättchen.

[1]) O. Tunmann, Zur Mikrochemie von Rubia tinctorum, Pharm. Zentralhalle, 1912, LIII, S. 1178.

[2]) Gut kristallisierte Präparate erhält man, wenn man Chrysarobin aus Benzolweingeist (Hager) Paraffin, Sesamöl oder Eisessig kristallisiert (Jennrich).

[3]) R. Eder, Über das Chrysarobin des Handels, Arch. d. Pharmazie, 1915, CCLIII, S. 1 und 1916, CCLIV, S. 1.

[4]) L. Rosenthaler, Pyroanalyse der Drogen, Ber. deutsch. pharmaz. Ges., 1911, XXIX, S. 527.

Setzt man Kalilauge zu den Sublimaten, so entsteht zunächst eine kirschrote, später eine violette Färbung.

Arbutin

Arbutin (Vaccinin, Kawalier, 1852) bildet glänzende, bitter schmeckende Nadeln und Prismen, die zu Säulen und Tafeln verwachsen. Die Kristalle lösen sich unter Deckglas langsam in kaltem, schnell in warmem Wasser und in Weingeist. Bei der Hydrolyse (Emulsin, verd. Säuren) zerfällt Arbutin in Glykose und Hydrochinon. Die Handelsprodukte enthalten meist Methylarbutin. Ein davon freies Produkt liefert Arctostaphylos aus Spanien, Finnland, Dänemark, Norwegen und Polen. Arbutin schmilzt bei 163°, wird dann fest und schmilzt nochmals bei 200°. Arbutin kommt vor in Arctostaphylos uva ursi, u. A. glauca, Gaultheria procumbens, Pirola rotundifolia, a. P.-Arten, Chimaphila maculata, Vacinium vitis idaea, Kalmia latifolia, K. angustifolia, Epigea repens, Grevillea robusta, Hakea lawrina (Proteaceae). Auch in Pirus communis und Pirus sinensis ist Arbutin gefunden worden. Ferner im Wurzelstock des Badans (Saxifraga crassifolia).

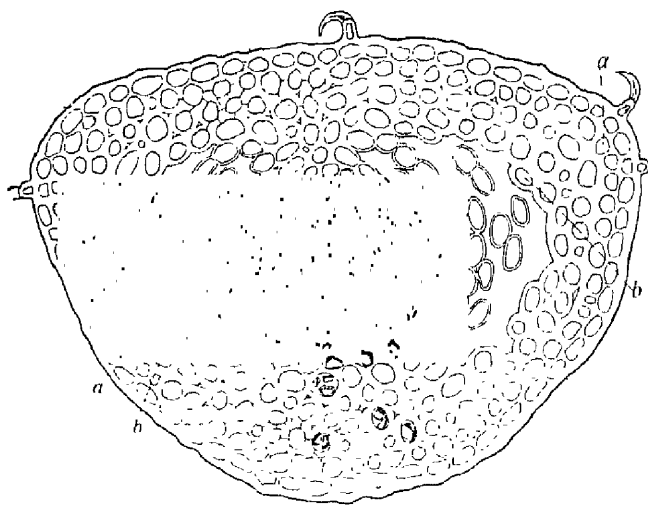



Fig. 140. Arctostaphylos uva ursi (Blattstiel, Querschnitt in Salpetersäure, einige Oxalate eingezeichnet), von a bis b Glykosidzone (Tunmann)

Nach Weevers[1]) ist Arbutin ein Reservestoff (Pirus communis, Vaccinium vitis idaea), dessen Zucker beim Austreiben der Knospen im Frühjahr verbraucht wird, während das in den Zellen verbleibende Hydrochinon zur Neubildung von Arbutin dient.

Zum Nachweis des Arbutins im Gewebe legt man die Schnitte erst einige Augenblicke in verdünnte Schwefelsäure und setzt dann Salpetersäure zu (Tunmann[2])). Die arbutinhaltigen Zellen nehmen sofort dunkelorange bis dunkelrotbraune Färbung an, werden aber bald leuchtend gelb bis chromgelb. Chemineau (1904) verwendet verdünnte Salpetersäure ($4\,HNO_3 + 1\,H_2O$ oder $2\,HNO_3 + 1\,H_2O$). Nach längerem Liegen der Präparate in Salpetersäure verblaßt die Färbung. Reines Arbutin reagiert in gleicher Weise mit Salpetersäure[3]). Da Arbutin zwar in Alkohol, aber nicht in Äther löslich ist, so

[1]) Th. Weevers, Die physiologische Bedeutung einiger Glykoside, Extr. du Rec. d. trav. bot. Néerl., 1910, VIII.

[2]) O. Tunmann, Über Folia uvae ursi und den mikrochem. Nachweis des Arbutins, Pharm. Zentralh., 1906, XLVII, S. 945.

[3]) C. Reichard, Chem. Ztg., 1906, XXX, S. 65.

kann man vor der Reaktion Chlorophyll und Fette durch längeres Behandeln der Präparate mit Ätherweingeist entfernen. Die Reaktion tritt mit großer Schärfe ein, die Färbung hält sich einige Zeit in Glyzerin und Glyzeringelatine. In den Blättern von Arctostaphylos uva ursi und von Kalmia latifolia fehlt das Glykosid nach Tunmann in der Epidermis (während Chemineau sie dort findet), im Holz- und Siebteil, in den Markstrahlen der Bündel, kommt aber in den Palisaden und noch mehr im Blattmesophyll vor. Im Blattstiel zeichnet sich vornehmlich das subepidermale Parenchym durch hohen Glykosidgehalt aus (Fig. 140). Die Arbutinzellen werden außerdem in vielen Fällen (Arctostaphylos), Kalmia) infolge gleichzeitiger Anwesenheit von Gerbstoff durch Vanillinsalzsäure stark gerötet. Hat man ein Präparat mit Vanillinsalzsäure behandelt, dann bewirkt Salpetersäure, den etwas abgespülten Schnitten zugesetzt, Überführung der roten Farbe in Chromgelb. Jungmann hat zum Nachweis Phosphormolybdänsäure[1]) in alkalischer Lösung empfohlen (Blaufärbung); die Reaktion ist jedoch nicht so brauchbar wie die mit Salpetersäure. Auch die Blaufärbung mit Ferrichlorid ist nicht empfehlenswert.

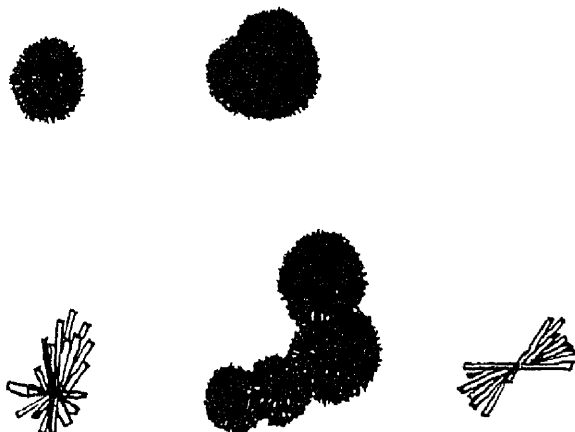



Fig. 141. Verbindung aus Arbutin und p-Nitrosodimethylanilin

Wie unsicher die Angaben über Lokalisation des Arbutins sind, zeigt die Tatsache, daß Goris, der offenbar das Reagens von Chemineau benutzte, weitgehende Angaben über die Lokalisation des Arbutins in Stengel und Blatt von Arbutus Unedo L. macht, das nach meinen Untersuchungen frei von Arbutin ist.

Arbutin gibt eine sehr charakteristische Reaktion mit Nitrosodimethylanilin[2]). Versetzt man eine frisch bereitete Lösung (0,2 g p-Nitrosodimethylanilin-Hydrochlorid, 0,15 g Natriumazetat, 10 g Wasser, filtrieren) des Nitrosoderivats mit einem Körnchen Arbutin, so bilden sich allmählich tief orangerote aus Stäbchen zusammengesetzte Drusen und Sterne; beim Verdunsten treten vom Rande her baumartige Verzweigungen derselben Farbe auf (Fig. 141). Leider ist diese Reaktion zum Nachweis des Arbutins in den Blättern nicht zu brauchen, da der ebenfalls

[1]) Phosphormolybdänsaures Natrium 0,5 g, Salzsäure 5 ccm, Wasser 15 ccm, Ammoniak 3 Tropfen.

[2]) L. Rosenthaler, Chemische Charakterisierung von Drogen, Pharmac. Acta Helvetiae, 1926, I, S. 72.

darin enthaltene Gerbstoff sie stört, ebenso wie auch die Blaufärbung, die Arbutin mit Ferrichlorid gibt. Auch die orangerote Färbung, die Arbutin mit Millons Reagens gibt, kann im Gewebe nicht angewandt werden.

Erhitzt man Arbutin auf der Asbestplatte, so zersetzt es sich und man erhält ein Sublimat von Hydrochinon (kleine monokline Blättchen, Prismen und Zerrformen); dasselbe Sublimat erhält man, wenn man ein wenig des Bärentraubenblattes erhitzt. Die Kristalle lösen sich in Wasser, Weingeist und Äther[1]).

Zum Nachweis des Hydrochinons löst man es in möglichst wenig Wasser und gibt ein paar Kriställchen Chinon hinzu. Es kristallisieren dann — meist unmittelbar an diesen — die tiefbraunen Kristalle (z. B. Spieße) des Chinhydrons. Empfindlicher ist der Nachweis mit p-Nitrosodimethylanilin (Behrens). Es entstehen gelbliche Kristallrosetten mit oft blattähnlichen verbreiterten Zweigenden (Fig. 142).

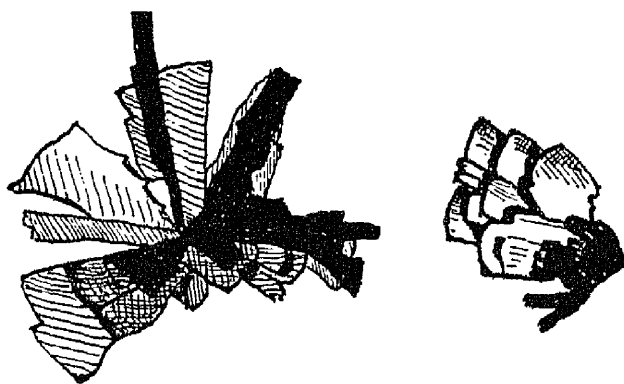



Fig. 142. Verbindung aus Hydrochinon und p-Nitrosodimethylanilin

Die oben erwähnte Vanillinsalzsäure-Reaktion kommt nicht dem Arbutin zu, die Arbutinzellen von Vaccinium myrtillus geben beispielsweise keine Rotfärbung[2]). Die Reaktion läßt sich aber zur Differentialdiagnose der offizinellen Folia uvae ursi von ihren Verwechselungen verwerten (Tunmann[3]), wie aus folgender Zusammenstellung hervorgeht. Quer- oder Längsschnitte werden in einen Tropfen Reagens eingetragen. Die Reaktionen treten innerhalb 1—2 Minuten ein und sind makroskopisch sichtbar (s. S. 585).

Fischer und Linser[4]) lassen 0,5—1,0 g gepulvertes Pflanzenmaterial mit 3—4proz. Salzsäure durchfeuchten, 25 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzen und nach Trocknen im Vakuumexsikkator mit Äther ausziehen. Der Rückstand des Ätherextrakts (s. S. 38)

[1]) O. Tunmann, Der weitere Ausbau der Mikrosublimationsmethode und der Nachweis des Arbutins in Pflanzen, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1911, XXI, S. 312; L. Rosenthaler l. c.

[2]) Der Gehalt an Arbutin in Vaccinium myrtillus muß sehr gering sein; zuweilen gelingt der Nachweis nicht, auch nicht makrochemisch mit 1 bis 2 Blättern.

[3]) O. Tunmann, Folia uvae ursi und ihre Verwechslungen, Pharm. Ztg., 1906, LI, S. 757.

[4]) R. Fischer und E. Linser, Der mikrochemische Nachweis geringer Mengen von Arbutin und Urson in den Pflanzen. Arch. der Pharmazie, 1930, CCLXVIII, S. 185.

Blätter von	Vanillin-salzsäure	Ferrosulfatlösung	
		Präparat	Lösung
Arctostaphylos uva ursa	rot	schwarz	blauschwarz
Buxus sempervirens	farblos	unverändert	farblos
Vaccinium vitis idaea	rot	dunkel	farblos bis schwach gelb
Vaccinium myrtillus	kaum gefärbt	bräunlich	farblos

wird im Fischerschen Apparat bei 110—125° sublimiert. Das Hydrochinon wird durch Schmelzpunkt und Reaktionen identifiziert.

Baptisin

In der Wurzel von Baptisia tinctoria R. Br. kommen neben ein wenig Cytisin zwei Glykoside vor (Schroeder, 1885), das Baptisin und das Baptin.

Baptisin bildet weiße, dünne, geschmacklose, meist zu Drusen gruppierte Kristallnadeln. F. 244°. Schwer löslich in Wasser und verdünntem Weingeist, leichter beim Erwärmen. Sehr wenig löslich in Chloroform, Äther, Azeton, Benzol und Ligroïn, leicht in Eisessig und auch in Ätzalkalien, nicht in Ammoniak.

Der mikrochemische Nachweis des Baptisins erfolgt nach Tunmann[1]) 1. durch Farbenreaktionen, 2. durch Abscheidung von Baptisinkristallen, 3. durch Mikrosublimation.

Fig. 143. Baptisinkristalle im Sublimat.. Sphärite gleicher Ausbildung entstehen bei der Behandlung von Schnitten mit Essigsäure (Tunmann).

1. Mit Vanadin-Schwefelsäure tritt zuerst am Rande der Schnitte eine violette Färbung auf, die bald vorübergehend schwach blau wird. Cerschwefelsäure und Wolframschwefelsäure färben rotviolett.

2. Man kocht mehrere Schnitte unter Deckglas in Essigsäure; nach dem Eindunsten der Flüssigkeit scheiden sich am Deckglasrande eingebettet in eine braune homogene Masse zahlreiche hellgelbe bis

[1]) O. Tunmann, Der mikrochemische Nachweis des Baptisins in Baptisia tinctoria (Wurzel), Apotheker-Ztg., 1915, XXX, S. 272.

50 μ große Sphärite von Baptisin aus. Nimmt man verdünnten Weingeist, wobei man zwei- bis dreimal unter neuem Zusatz von Weingeist aufkochen muß, so fallen lebhaft polarisierende Drusen mit kleinem, zentralem Hohlraum aus.

Fig 144a. Bei 210° erhaltene Kristalle aus Baptisia-Wurzel

3. Die ersten Sublimate (aus 3—5 mg Wurzelpulver) führen nur farblose oder schwach gelbliche, kräftig polarisierende aus Nadeln bestehende Drusen, die aus Baptisin bestehen, die folgenden farblose in allen Farben polarisierende Prismen und prismatische Zerrformen in Gestalt von Sicheln, dann Säbel-, Schmetterlings- und Schwalbenschwanzformen, in den letzten finden sich große bandartige Gebilde. In den letzten Sublimaten finden sich Spaltungs- und Zersetzungsprodukte des Baptisins (Fig. 144a u. b).

Fig. 144b. Bei 250° erhaltene, zum Teil braun gefärbte Baptigeninkristalle

Die Sublimate geben folgende Reaktionen: Vanadinschwefelsäure färbt rot, nach einigen Minuten violett, nach 15 Minuten braunblau. Bringt man zu einem Sublimat erst Schwefelsäure und dann Wolframsäure, so entsteht an jedem Splitterchen eine kräftige Violettfärbung.

Man gibt ferner zu einem Sublimat unter Deckglas etwas Jodsäurelösung, saugt nach einigen Minuten trocken, wäscht mit Wasser nach und setzt Schwefelsäure zu. Die Kristalle werden rötlich, allmählich dunkelviolett, fast schwarz und lösen sich, während gleichzeitig der Säuretropfen an den Rändern blaugrau wird.

Baptisin ist lokalisiert: Im Parenchym der primären und sekundären Rinde, in den Markstrahlen und im Holzparenchym und findet sich auch in der getrockneten Pflanze (Droge) nur in den Zellinhalten. In lange gelagerter Droge trifft man bisweilen Baptisin kristallinisch ausgeschieden an. Man findet im Rindenparenchym und den Markstrahlen des Holzes braune kristallinische Klumpen, in denen Gruppen von Nadeln sichtbar werden, wenn man mit Wasser aufkocht oder stark verdünnte Chloralhydratlösung einwirken läßt.

Blausäure-Glykoside

Während wir bisher über 500 Arten kennen, aus denen sich Blausäure erhalten läßt[1]), ist die Zahl derjenigen Pflanzen, aus denen bisher Blausäure-Glykoside dargestellt wurden, eine verhältnismäßig geringe.

Das älteste bekannt gewordene Glykosid dieser Gruppe, das l-Amygdalin, ist aus allen Blausäure gebenden Samen der Prunoideen und Pomoideen isoliert worden, in denen danach gesucht wurde; in den vegetativen Teilen derselben Familien findet sich entweder Prunasin (l-Mandelsäurenitrilglukosid), so in den jungen Sprossen von Prunus padus L., der Rinde und den Blättern von Prunus serotina Ehrhart, den Blättern von Photinia serrulata Lindl. und denen von Prunus macrophylla Sieb. et Zucc. oder Prulaurasin (i-Mandelnitrilglykosid), so in den Blättern von Prunus laurocerasus L., den beblätterten Zweigen von Cotoneaster microphylla Wall. und wahrscheinlich in den Blättern von Cydonia vulgaris Pers.

Sambunigrin (d-Mandelnitrilglukosid) ist aus den Blättern von Sambucus nigra L. und Sambucus pyramidalis dargestellt worden.

Vicianin (Mandelsäurenitrilvicianosid) findet sich in Wicken-Samen und wurde aus den Samen von Vicia angustifolia All. und Vicia macrocarpa Bert. isoliert. Dhurrin (p-Oxymandelsäurenitrilglukosid) ist nur aus Sorghum vulgare L. bekannt. Verbreiteter ist Linamarin (Phaseolunatin). Es wurde bisher gefunden in der ganzen Pflanze, den Samen und Keimlingen von Linum usitatissimum L., den Samen und Blättern von Phaseolus lunatus L., den Wurzeln von Manihot aipi Pohl und Manihot utilissima Pohl, den Blättern von Hevea brasiliensis Müller, in Dimorphotheca Ecklonis D. C. und wahrscheinlich in den Früchten von Holocalyx balansae Mich.

[1]) Über die Verbreitung der Blausäure s. L. Rosenthaler, Schweiz. Apoth.-Ztg., 1919, LVII, S. 279; ebenda, 1921, LIX, S. 466; Pharmaceutica Acta Helvetiae, 1926, I, S. 167; ebenda, 1928, III, S. 31; Biochem. Zeitschr., 1922, CXXXIV, S. 215; Pharmac. Acta Helvetiae, 1929, IV, S. 196.

Lotusin (Spaltungsprodukte: Lotoflavin, Blausäure und Glykose) kommt in Lotus arabicus L. vor, Gynocardin (Spaltungsprodukte: $C_6H_8O_4$, Blausäure und Glykose) in den Samen von Gynocardia odorata R. Br. und den Blättern von Pangium edule Reinw.; Karakin und Corynocarpin finden sich in den Samen von Corynocarpus laevigata Forst.

In weiterem Sinne gehört noch hierher das Hiptagin aus der Wurzelrinde von Hiptago Madablota Gaertn., das durch Hydrolyse neben Glykose ein nicht faßbares, durch Alkalien u. a. Blausäure lieferndes Aglykon Hiptagenin entstehen läßt.

Nichtglykosidische Blausäureverbindungen sind bisher nicht aus Pflanzen isoliert worden; mit ihrem Vorkommen ist aber zu rechnen und es ist sicher, daß die Blausäure in den Samen von Schleichera trijuga Willd. nicht in glykosidischer Form vorhanden ist[1]).

Nichtglykosidisch gebundene Blausäure könnte in Form von Oxynitrilen der Aldehyde und Ketone auftreten und da diese Verbindungen bei Gegenwart von Wasser ein Gleichgewicht bilden, als dessen Bestandteil Blausäure auftritt, so kann man in einem solchen Fall von locker gebundener Blausäure reden; es ist nicht ausgeschlossen, daß dann auch Spuren freier Blausäure in der Zelle auftreten. Es ist auch nichtglykosidische Blausäure in den Knospen von Prunus laurocerasus und den Blättern von Sambucus nigra nachgewiesen worden[2]). Irgendwelche erhebliche Konzentrationen von freier Blausäure sind aber ausgeschlossen. Blausäure ist zwar nicht, wie manchmal behauptet wird, ein allgemeines Enzymgift, sie befördert sogar den Abbau von Eiweißstoffen durch Papain (Willstätter u. Graßmann) u. a. Enzyme, aber sie schädigt die Assimilation (O. Warburg) und die Atmung (H. Schroeder). Sie ist ein Katalasegift und schädigt nach Warburg das Atmungsenzym durch die Wirkung auf das zu dessen Funktionieren nötige Eisen. Bei Chlorella und ähnlichen Algen hemmt Blausäure in einer Konzentration von etwa 10^{-4} bis 10^{-5} Molen per Liter die Assimilation, aber nicht die Oxydationen, die vielmehr beschleunigt werden. Die Wirkung der Blausäure ist darin zu suchen, daß sie die Umwandlung der Kohlensäure in ein Produkt hemmt, das der photochemischen Reduktion in der bestrahlten grünen Zelle unterliegt (Warburg).

Viele Versuche liegen über die Keimlinge schädigende Wirkung der Blausäure vor, aus neuerer Zeit u. a. von Jungmann u. Wehmer. Letzterer hat auch gezeigt, daß die pflanzenschädigende Wirkung des Leuchtgases auf dessen Blausäuregehalt zurückzuführen ist.

Über die physiologische Bedeutung der Blausäure-Verbindungen ist ein abschließendes Urteil nicht möglich. Die Treubsche Hypothese, wonach Blausäure das Zwischenprodukt der Eiweißbildung sei, ist unhaltbar. Für einen Teil der Blausäureverbindungen ist es wahrscheinlich, daß sie sich auf einem Seitenweg des Aminosäure-Stoffwechsels bilden[3]).

[1]) L. Rosenthaler, Über die Samen von Schleichera trijuga, Schweiz. Apoth.-Ztg., 1920, LVIII, S. 17.

[2]) L. Rosenthaler, In welcher Form kommt Blausäure im Pflanzenreich vor? Schweiz. Apoth.-Ztg., 1919, LVII, S. 571.

[3]) L. Rosenthaler, Zur Prüfung der Treubschen Hypothese I, Biochem. Zeitschr., 1922, CXXXIV, S. 215; dasselbe II, ebenda, 1927, CXC, S. 168.

Bei Kirschlorbeerblättern besteht kein Zusammenhang zwischen Licht und Blausäurebildung; beim Absterben der Blätter wird die Blausäure verbraucht. Während der Entfaltung der Knospen nimmt die Blausäure zu, wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Eiweißbildung. Bei Pfropfungen konnte Guignard[1]) einen Übertritt durch die Propfstelle nicht ermitteln.

Für die Untersuchung vegetativer Teile von Blausäurepflanzen muß frisches Material verwendet werden, da die Blausäureglykoside beim Welken zersetzt werden. Ferner tritt Abgabe von Blausäure ein, wenn frische Pflanzenteile, die Blausäureglykoside und Enzyme enthalten, den Dämpfen von Chloroform, Chloräthyl, Äther, Schwefel kohlenstoff oder Quecksilber ausgesetzt werden[2]).

Der mikrochemische Nachweis von Blausäureglykosiden im Pflanzengewebe ist noch in keinem Fall geglückt. Alle bisher bekannten Verfahren beschränken sich darauf, die aus den Verbindungen abgespaltene Blausäure nachzuweisen.

Das älteste dazu benutzte Verfahren ist das von Greshoff und Treub[3]), das auf der Bildung von Berliner Blau beruht.

Die Objekte gelangen zunächst auf einige Augenblicke (je nach der Stärke bis auf 1 Minute) in 5—10proz. weingeistige Kalilauge (nach Treub: 2 Vol. 20proz. wässerige Kalilauge + 8 Vol. 90proz. Weingeist). Dann kommen sie auf 2 bis 5, evtl. bis 15 Minuten in eine Eisenlösung (eine frisch bereitete und auf Siedetemperatur erhitzte Mischung von 2,5proz. wässeriger Ferrosulfatlösung und 1proz. wässeriger Ferrichloridlösung). Schließlich werden sie auf 5 Minuten in 20proz. Salzsäure übertragen. Zur Ausführung lassen sich auch Schnitte benutzen. Vielfach wird die Benutzung kleinerer Stücke vorteilhaft sein; von den behandelten Stücken werden von den blau gefärbten Schnitträndern erst die Schnitte hergestellt. Zur makroskopischen Demonstration der Verteilung der Blausäure in Blättern werden die Blätter mit einer steifborstigen Bürste, am besten einer solchen mit Metallnadeln, geklopft, und ihnen auf diese Weise möglichst viele kleine Wunden beigebracht. Die geklopften Blätter werden dann in toto der Berlinerblau-Reaktion unterworfen. Um die Wunden entstehen blaue Flecke. Entfernung des Chlorophylls durch nachträgliche

[1]) L. Guignard, Physiol. Untersuchung über die Pfropfung der Blausäurepflanzen, Ann. sciences nat. Bot., 1907, VI, S. 261.

[2]) M. Mirande, Compt. rend. Acad. sciences, 1909, CIL, S. 140.

[3]) M. Treub, Sur la localisation, le transport et rôle de l'acide cyanhydrique dans le Pangium edule Reinw., Annal. jardin Buitenzorg, 1896, XIII, S. 1; Kritik des Verfahrens bei L. Rosenthaler, Über den Nachweis der Blausäure in Pflanzen, Schweiz. Apoth.-Ztg., 1922, LX, S. 477.

Behandlung der Blätter mit Weingeist läßt die Niederschläge von Berlinerblau deutlicher hervortreten.

Man kann zwar mit diesem Verfahren Blausäure im Pflanzengewebe nachweisen, zur Bestimmung der Lokalisation ist es aber völlig ungeeignet, da als Zwischenprodukt das wasserlösliche und also diffundierende Kaliumferrocyanid auftritt. Andererseits gibt es nur wenige im Pflanzenreich vorkommende Blausäureverbindungen, die beim Kochen mit Kalilauge unter Bildung von Cyanid zersetzt werden, eine für das Eintreten der Berlinerblau-Reaktion notwendige Voraussetzung.

Peche[1]) benutzte zu Lokalisationsstudien eine 3proz. wässerige Lösung von Merkuronitrat[2]), mit dem sich Blausäure in folgender Weise umsetzt:

$$2\,HCN + Hg_2(NO_3)_2 = Hg(CN)_2 + 2\,HNO_3 + Hg.$$

Bei Gegenwart von Blausäure entsteht also Quecksilber, dessen Tröpfchen mikroskopisch wahrgenommen werden können.

Mit dem Pecheschen Reagens läßt sich zweifellos freie oder leicht abzuspaltende Blausäure nachweisen. Inwieweit sie zum Nachweis glykosidisch gebundener Blausäure brauchbar ist, scheint von Nebenumständen abzuhängen, u. a. von dem Verhältnis der Menge des Reagens zu der Menge der vorhandenen Eiweißstoffe, die wohl das zur Zersetzung des Glykosids nötige Enzym vor der Zerstörung durch das Pechesche Reagens schützen. Versetzt man nämlich eine Amygdalinlösung mit dem Pecheschen Reagens und dann mit Emulsin, so wird das Amygdalin nicht zersetzt; zerreibt man aber einige bittere Mandeln mit ein wenig des Reagens, so tritt nach einiger Zeit der Geruch nach Benzaldehyd auf und letzterer kann auch exakt nachgewiesen werden.

Andererseits ist zu bedenken, daß das Pechesche Reagens auch mit anderen Stoffen als Blausäure Schwärzung oder Abscheidung von metallischem Quecksilber gibt, so mit Ammoniumsalzen (z. B. Ammoniumnitrat), Ferrosalzen, Eiweiß, mehrwertigen Phenolen, Gerbstoffen u. dgl. mehr.

Die Methode verlangt ein schnelles und sauberes Arbeiten. Zum Schneiden ist ein Schlittenmikrotom zu empfehlen; das Messer ist nach jedem Schnitt gut zu reinigen. „Man macht rasch nicht allzu dünne Schnitte durch Blätter oder Stengel unter starker Befeuchtung des Messers und des Objektes mit dem Reagens und läßt in diesem die

---

[1]) K. Peche, Mikroch. Nachweis der Cyanwasserstoffsäure in Prunus laurocerasus, Sitzgsber. Wien. Akad., 1912, CXXI, S. 33.

[2]) Merkuronitrat ist leicht herzustellen, indem man in einem Präparatenglase 1 Teil Quecksilber mit 1,5 Teilen Salpetersäure (25proz. offizinelle) einige Tage stehen läßt. Es kristallisieren farblose Tafeln und Säulen aus. Millons Reagens ist eine oxydhaltige Lösung von Quecksilberoxydulnitrat.

Schnitte etwa 1—2 Minuten liegen, worauf man sie in destilliertem (!) Wasser auswäscht. Hierauf können sie in Glyzerin oder Kanadabalsam eingelegt werden."

Ein drittes Verfahren[1]), Blausäure im Gewebe nachzuweisen, beruht darauf, daß Stärkekörner, die mit Jod blau gefärbt sind, sich mit Blausäure entfärben: $J_2 + 2\,HCN \rightleftharpoons JCN + 2\,HJ$.

Die Schnitte werden auf dem Objektträger mit einer dicken Aufschwemmung von gejodeten Reisstärkekörnern[2]) versetzt. Dann wird *ein Tropfen einer 1proz. Lösung von Emulsin in 50proz. Glyzerin hinzugefügt*, das Deckglas darauf gelegt, zur Durchmischung abgehoben und wieder daraufgelegt, was einige Male rasch wiederholt werden kann. Danach ist das Präparat vor jeder Änderung, die eine Flüssigkeitsbewegung verursachen kann, zu schützen. Wesentlich ist, recht viele Stärkekörner in die Zellen hineinzubekommen, damit die freiwerdende Blausäure auf möglichst viele gejodete Stärkekörner stößt und durch Bindung an deren Jod an der Diffusion gehindert wird. Der Diffusion wird auch durch den Zusatz des Glyzerins entgegengewirkt, der die Viskosität erhöht.

In allen den Fällen, wo ein das Glykosid spaltendes Enzym neben jenem vorhanden ist, zeigt die Reaktion die Lokalisation des Glykosides an, da das Enzym durch die gejodeten Stärkekörner nicht an der Wirkung gehindert wird.

Fehler sind dadurch möglich, daß noch andere Stoffe vorhanden sind, welche Jod entfärben. Vor einem Teil dieser Fehler kann man sich dadurch schützen, daß man die Schnitte vor Anstellen der Reaktion mit Petroläther oder Äther behandelt, die Blausäureglykoside nicht lösen, ferner auch dadurch, daß man nach eingetretener Entfärbung ansäuert: war die Entfärbung durch Blausäure bedingt, so muß dann wieder Blaufärbung eintreten.

Mit Hilfe der letzteren Methode fanden Rosenthaler und Seiler Amygdalin in den bitteren Mandeln: im Endosperm und im gesamten Parenchymgewebe der Kotyledonen, nicht in der Samenschale. Der Amygdalingehalt schwankt von Schnitt zu Schnitt, ja von Zelle zu Zelle. Bei Kirschlorbeerblättern wurde (Anfang März) folgendes über die Verteilung des Prulaurasins gefunden: die obere und untere Epidermis der Blattspreite enthalten kein Prulaurasin mit der Ausnahme,

---

[1]) L. Rosenthaler l. c., S. 589, Anmerkung 3. L. Rosenthaler u. K. Seiler, Über die Lokalisation der Blausäureglykoside und des Emulsins in bittern Mandeln und Kirschlorbeerblättern, Ber. deutsch. pharmaz. Ges., 1922, XXXII, S. 245.

[2]) Die Körner müssen neutral reagieren und werden mit so schwacher Jodlösung behandelt, daß sie schwach blau werden. Die überschüssige Jodlösung wird durch Auswaschen entfernt.

daß in solchen Zellen (Schließzellen), in denen Chloroplasten auftreten, auch Prulaurasin vorhanden ist. Es ist sowohl in den Palisaden als im Schwammparenchym vorhanden, am meisten in den Sammelzellen. Die Oxalatzellen sind frei davon.

Im Mittelnerv ist Prulaurasin in den Markstrahlen, im Siebteil und wahrscheinlich auch im Kambium. Frei von Prulaurasin sind die beiden Epidermen, Endodermis und Guignards pericycle selérifié, Gefäße, Oxalatzellen und das Kollenchym, soweit es frei von Chlorophyll ist.

Ältere Angaben über bittere Mandeln und Kirschlorbeerblätter: L. Guignard, Sur la localisation dans les amandes et le laurierccrise des principes, qui fournissent l'acide cyanhydrique, Bull. soç. belge de micr., 1890, XVI, S. 66; über Kirschlorbeerblätter K. Peche l. c.

Leichter ausführbar als der Nachweis der Blausäureglykoside in den Zellen ist ihr Nachweis (richtiger der der aus ihnen entstehenden Blausäure) in einzelnen Geweben. Hat man das zu untersuchende Gewebe auf mechanischem Wege sorgfältig abgetrennt, so bringt man es in eine Mikrogaskammer, befeuchtet frische Objekte mit einigen Tropfen Chloroform, trockene Objekte mit wenig Wasser[1]) und verschließt die Kammer durch ein Deckgläschen, an dem man als hängenden Tropfen das Reagens angebracht hatte. Zum Nachweis der Blausäure eignen sich unter diesen Verhältnissen:

1. Mit Methylenblau versetzte Silbernitratlösung (Brunswik[2])). Das Reagens wird nach Malitzky und Koslowsky[3]) am besten folgendermaßen bereitet: 1 ccm 10proz. Silbernitratlösung wird mit 4 ccm wässeriger Methylenblaulösung verdünnt, sodann werden 5 ccm Salpetersäure (1,4 spez. Gew.) zugesetzt. Das Gemisch wird filtriert. Die Lösung ist innerhalb eines Monats zum Gebrauche geeignet. Mit Blausäure entstehen blaugrüngefärbte Nadeln von Silbercyanid (ohne die Gegenwart von Salpetersäure auch Körnchen, Ranken, Drusen und Sphärite). Die Silbercyanidkristalle leuchten im polarisierten Licht auf und zeigen gerade Auslöschung (Unterschied gegenüber Silberchlorid).

[1]) In manchen Fällen, so bei Herbarmaterial, in dem die Enzyme häufig abgestorben sind, empfiehlt es sich, noch ein wenig des entsprechenden Enzyms zuzusetzen.

[2]) H. Brunswik, Der mikrochemische Nachweis pflanzlicher Blausäureverbindungen. Eine neue mikrochemische Methode zum Nachweis von Cyanwasserstoff und Emulsin, Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien. Math. naturwiss. Kl., Abt. I, 1921, CXXX, S. 383.

[3]) W. P. Malitzky u. M. T. Koslowsky, Über die mikrochemische Bestimmung von Blausäure mittels der Brunswik-Reaktion, Mikrochemie, 1929, VII, S. 94.

Erfassungsgrenze: 0,06 γ HCN im Normaltropfen (Brunswik).

2. Das Benzidin-Kupfer-Reagens[1]). Man verwendet ein Gemisch von 1 ccm dreiprozentiger Kupriazetatlösung, 10 ccm gesättigter Benzidinazetatlösung und 16 ccm Wasser. Es entstehen blaue nadelförmige Kristalle oder (mit mehr Blausäure) ultramarinblaue Körnchen und Nädelchen. Die Kristalle zeigen gerade Auslöschung und Pleochroismus. Erfassungsgrenze 0,02 γ HCN im Normaltropfen.

3. Mit Jod schwach blau gefärbte Stärkekörnchen (s. S. 591). Rötung und folgende Entfärbung zeigt bei Abwesenheit anderer mit Jod reagierender Stoffe Blausäure an.

Die Empfindlichkeit der Reaktion ist desto größer, je geringer die Zahl der Stärkekörner und je schwächer ihre Blaufärbung ist.

4. Das Alloxan-Reagens[2]). Man erhitzt in einem starken Reagenzglas 1 g Harnsäure, 1 ccm Salpetersäure (spez. Gew. 1,39—1,40) und 1 ccm Wasser bis zur völligen Klärung und verdünnt dann mit 50 ccm Wasser[3]). Ein Tröpfchen des Reagens wird auf dem Deckglas mit einer Spur Ammoniak alkalisch gemacht. Oder man bringt auf das Deckglas ein Tröpfchen 2proz. Ammoniak, läßt zunächst die Blausäure einwirken und bringt dazu noch einen Tropfen Alloxan-Reagens. In beiden Fällen entstehen Kristalle von Oxaluramid. Die Reaktion wird noch empfindwenn man das Ammoniak durch Pyridin ersetzt.

Bryonin

Als Bryonin wird jetzt — ungeachtet mehrerer ebenso genannter Vorgänger — das von Walz[4]) beschriebene bittere Glykosid der Bryonia-Wurzeln bezeichnet. Da es nur im amorphen Zustande gewonnen wurde, ist seine chemische Individualität zweifelhaft. Es ist in Wasser und Weingeist löslich, nicht in Äther und Chloroform. Durch verdünnte Säuren wird es in Glykose (?), einen wasserunlöslichen Stoff und mehrere flüchtige Stoffe gespalten.

Bryonin wird mit Schwefelsäure (auch phenolhaltiger) rot, mit Fröhdes Reagens (s. S. 434) rot, dann grün, mit Mandelins Reagens (s. S. 434) blutrot, dann blauviolett.

[1]) J. Moir, New sensitive test for hydrocyanic acid., Proc. chem. soc., 1910, XIV, S. 115; Referat in Pharmac. Journ., 1910, LXXXIV, S. 759; C. Pertusi u. E. Gastaldi, Neue allgemeine Methode zum Nachweis der Blausäure, Chem. Ztg., 1913, XXXVII, S. 609. H. Brunswik l. c., S. 592, 2.

[2]) G. Denigès, Utilisation des propriétés catalytiques dans l'analyse microcristalline, Mikrochemie, 1926, IV, S. 149; ältere Publikation: Cpt. rend. soc. biol., 1921, LXXXIV, S. 309; Journ. pharm. chim., 1921 [VII], 23, S. 294.

[3]) Oder man kocht 0,1 g Harnsäure mit 0,2 g Salpetersäure und 0,2 ccm Wasser und fügt nach Klärung 5 ccm Wasser hinzu.

[4]) G. F. Walz, Weiterer Beitrag zur Untersuchung der Familie der Cucurbitaceen, Neues Jahrb. f. Pharmazie, 1858, IX, S. 66.

Mit 1proz. Silbernitratlösung entsteht ein zinnoberroter Niederschlag; auch mit Tannin tritt Fällung ein.

Braemer[1]) behandelte die Schnitte vor der Einwirkung der Reagentien, über die er übrigens keine näheren Angaben macht, mit Äther; er gibt als den Sitz des Bryonins die Milchsaftbehälter an.

Cerberin

Von de Vrij aus den Samenkernen von Cerbera Odollam Gaertn. (Apocynaceae) dargestellt. Bitterschmeckende rhombische Kristalle oder Rosetten (F. 191—192°). Schwer löslich in Wasser und Äther, leicht in Weingeist, Chloroform, Eisessig. Konz. Schwefelsäure gibt eine gelbe Lösung, die vom Rande her allmählich violett und blau wird. Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure ergibt Glykose und Cerberetin (F. 85,5°).

Pool erhielt mit Schnitten durch die äußere Fruchtwand, die Keimlinge und die jungen Sprossen folgende Farbenreaktionen:

	Äußere Fruchtwand	Keimlinge	Junge Sprosse
Konz. Schwefelsäure	dunkelviolett	violett, später blau	violett
Dichromat-Schwefelsäure	dunkelviolett	violett	violett
Fröhdes Reagens	dunkelviolett	violett	violett, später braunviolett
Konz. Salzsäure	dunkelgrün	dunkelgrün	grün
Konz. Salpetersäure	gelb	gelb	gelb

Chellol-Glukosid

Das Chellol-Glukosid[2]) F. 175° aus der Umbellifere Ammi Visnaga löst sich in konzentrierten Säuren gelb, in nicht sauren Lösungsmitteln farblos. Löslich in heißem Wasser, schwer in Weingeist, leicht in Pyridin, fast nicht in Äther, Benzol, Chloroform.

Befindet sich nur in Frucht- und Samenschale (Kisser).

Colocynthin

Colocynthin ist der wenig bekannte, meist amorph erhaltene Bitterstoff der Früchte von Citrullus colocynthis Schrader. Löslich in Wasser und Weingeist, unlöslich in Äther. Hydrolyse soll Glykose und Colocynthein ergeben.

Nachweis durch Braemer wie bei Bryonin (s. oben). Lokalisation ebenfalls in den Milchsaftbehältern.

[1]) L. Braemer, Sur la localisation des principes actifs dans les Cucurbitacées, Compt. rend. Acad. sciences, 1893, CXVII, S. 753.

[2]) P. Fantl u. S. J. Salem, Chellol-Glukosid, Biochem. Zeitschr. 1930, CCXXVI, S. 166.

Coniferin

Das Glykosid Coniferin, gewonnen aus dem Kambialsaft der Nadelhölzer, stellt farblose Nadeln dar (F. 185°), die sich in 200 Teilen kaltem Wasser, leicht in heißem Wasser oder in Weingeist lösen und in Äther unlöslich sind. Bei der Hydrolyse spaltet sich Coniferin in Glykose und Coniferylalkohol. Von vielen Autoren wurde angenommen, daß die Reaktionen, die verholzte Membranen geben (s. d.), auf Coniferin hinweisen. Bei der Mikrochemie der Zellinhalte kommt Coniferin kaum in Betracht, obwohl es als Muttersubstanz mancher Sekretbestandteile in Frage kommt; die folgenden Farbenreaktionen dienen zur Orientierung.

1. Mit konz. Schwefelsäure blauviolett, allmählich purpurn.
2. Mit Phlorogluzin-Salzsäure purpurn.
3. Mit Phenol-Salzsäure violett.
4. Mit Anilinsulfat-Salzsäure (25proz.) tritt allmählich Gelbfärbung ein; verwendet man eine Lösung von Anilinsulfat in rauchender Salzsäure, so tritt dieselbe Färbung (erst purpurn, dann blau) ein, die auch mit letzterer allein eintritt. (Unterschied gegenüber verholzten Membranen, die sich unter diesen Umständen ebenfalls gelb färben.)
5. Erwärmt man Coniferin mit einer Lösung von Vanadylphosphat, zu der man ein wenig Salzsäure hinzugesetzt hat, so entsteht ein grobkörnig-kristallinischer, gelbrötlich brauner Niederschlag (Grüß)[1].

Über die Lokalisation des Coniferins ist nichts Sicheres bekannt. Doch ist es jedenfalls ein Bestandteil des Zellsafts und nicht, wie De Wèvre[2]) meinte, ein solcher der Membran.

Convallaria-Glykoside

Aus Convallaria majalis hatte Walz das kristallinische Convallarin und das amorphe Convallamarin gewonnen. Karrer stellte das Convallatoxin dar; es ist nicht identisch mit einer von Jacobs u. Hoffmann (Journ. biol. chem. **74**, 787 (1927) isolierten amorphen Substanz.

Convallatoxin[3]). Aus verd. Alkohol Nadeln oder Säulen. F. nach dem Trocknen bei 100°, 211—212° lufttrocken, 212—213° (unkorr.) nach vorhergehender Gelbfärbung; aus Essigäther Drusen F. 230°; aus Azeton lange Nadeln von etwa demselben F. Optisch inaktiv; bitter.

Löslich in etwa 2000 Teilen Wasser, nicht in Äther und Petroläther, schwer in Chloroform und Essigäther, leichter in Weingeist und Azeton. In konz. Schwefelsäure tiefrot.

Die Lösung in Essigsäureanhydrid wird mit einigen Tropfen Schwefelsäure rot, dann sehr rasch grün. Legalsche Reaktion positiv (wie Digitalis- und Strophanthusglykoside).

---

[1]) J. Grüß, Über ein neues Holz- und Vanillinreagens, Ber. deutsch. bot. Ges., 1920, XXXVIII, S. 361.

[2]) De Wèvre, La Lignine, Bull. soc. belg. Microsc. 1889, XV, S. 49.

[3]) W. Karrer, Darstellung eines kristallisierten herzwirksamen Glykosids aus Convallaria majalis L. Helv. Chim. Acta, 1929, XII, S. 506.

Bei der Kellerschen Reaktion[1]) rotbraune Zone, Eisessigschicht ungefärbt.

Die Schwefelsäurereaktion wurde von Theorin zum mikrochemischen Nachweis verwendet. Die Glykosidzellen (Blatt, Stamm, Wurzel) zeigen Violettfärbung. In neuerer Zeit hat Reichard verschiedene Farbenreaktionen für die isolierten Glykoside mitgeteilt, mit denen Tunmann aber in den Zellen keine Resultate erhalten konnte. Hingegen wurde eine tiefblaue Farbenreaktion erhalten beim direkten Einlegen der Schnitte in Froehdes Reagens. Die Reaktion entsteht sofort. Die Reaktionen mit Froehde und die mit Schwefelsäure treten in den gleichen Zellen ein. Sie sind am stärksten in den chlorophyllreichen Zellen und nehmen gleichzeitig mit dem Chlorophyllgehalt an Schärfe ab (Fig. 145). Die Reaktion mit Schwefelsäure wird nur durch Convallamarin bedingt, die mit Froehde kommt ausschließlich dem Convallarin zu. Beide Glykoside sind somit in Übereinstimmung mit Theorin in den Palisaden lokalisiert und in den Blattstielen in den chlorophyllführenden subepidermalen Zellen. Bei der Untersuchung ist auf pilzfreies Material zu achten, denn Mitlacher[2]) und Senft (Lit. S. 296, 2) haben gefunden, daß Pilze die Glykoside leicht zersetzen. Die Zerlegung gelang auch durch künstliche Infektion mit Schimmelpilzen. Der abgespaltene Zucker gelangt dann vorzüglich in der Epidermis zur Abscheidung (bei getrockneten Blättern in Kristallbüscheln).

Fig. 145. Convallaria majalis (Blatt), die Schraffierung zeigt den Sitz der Glykoside an (Tunmann)

An dem Rhizom von Convallaria majalis hat Kohli folgendes festgestellt: Gesättigte Ammonsulfatlösung gibt keine Fällung. Brombromwasserstoff, Silikowolframsäure und Uranylazetat erzeugen lokalisierte Fällungen außer in der Endodermis und im Xylem. Die Reaktionen treten in den mit 70 proz. Weingeist ausgekochten Schnitten nicht mehr ein.

Blutgelatine zeigt starke Hämolyse, besonders in Rinde und Endodermis. Dazu sei bemerkt, daß Convallarin durch Brombromwasserstoff gefällt wird, aber rote Blutkörperchen nicht hämolysiert.

Im Blatt beobachtete Kohli starke Fällungen mit den genannten Reagentien. Die Knospenblätter hämolysieren stark.

Coriamyrtin

Coriamyrtin, ein glykosidischer Bitterstoff der Früchte und Blätter von Coriaria myrtifolia L., wurde von Riban (Compt. rend., LVII, S. 798, LXIII,

---

[1]) Die Lösung in eisenhaltigem Eisessig wird mit eisenhaltiger Schwefelsäure unterschichtet.

[2]) W. Mitlacher, Pharmac. Post, 1902, XXXV.

S. 476) in monoklinen Prismen (F. 220°) erhalten, die sich leicht in Äther, Chloroform, Benzol, schwer in Wasser und kaltem Weingeist lösen und mit Brom und Jod kristallinische Verbindungen geben.

Der mikrochemische Nachweis des Coriamyrtins in den Blättern des Gerberstrauches wurde von Hanausek[1]) erbracht. Nach Vorbehandlung der Präparate mit Weingeist ruft Kalilauge im Blattmesophyll einen braunroten Niederschlag hervor. Durch nachfolgenden Zusatz von Schwefelsäure wird das Mesophyll wieder grün. Die Reaktion tritt auch ein, wenn der meiste Gerbstoff durch Auswaschen mit Wasser zuvor aus den Schnitten entfernt ist. Ammoniak bedingt einen braunen Niederschlag. Beweisend ist ferner die Reaktion mit Jodwasserstoff-Natronlauge. Man legt die Präparate in eine ältere Jodjodkaliumlösung (die bekanntlich stets Jodwasserstoffsäure enthält) und löst den entstehenden schwarzen Niederschlag in Weingeist. Setzt man alsdann einen Tropfen konz. Natronlauge zu, so bildet sich sofort eine purpurviolette Fällung, aus der sich tiefrote Körnchen abscheiden. Innerhalb 15 Minuten entsteht schließlich ein bleibender gelber Niederschlag. In den Blättern tritt das Glykosid in allen Teilen des Mesophylls auf, „nur das Füllgewebe und die Gefäßbündel scheinen dasselbe nicht zu enthalten".

Nach Villeneuve, der außer der zuletzt angegebenen Reaktion noch das Verhalten gegen Javellesche Lauge benützt (gelbbraune Färbung), befindet sich das Coriamyrtin hauptsächlich in der Endodermis der Blätter und Stiele. Es besteht also ein Widerspruch zu den Angaben von Hanausek.

(Villeneuve, Étude sur le Redoul (Coriaria myrtifolia) Thèse pharm., Montpellier 1893).

Crocin

Im Safran kommt ein Gemisch von Farbstoffen vor. Durch Versetzen eines wässerigen Safran-Auszugs mit Ätzkali erhielten Karrer u. Salomon β-Crocetin als Kaliumsalz, γ-Crocetin in freiem Zustande und durch Ansäuern des Filtrats das α-Crocetin. Letzteres kommt im Safran als Zuckerester (α-Crocin) vor[2]).

Chemisch ist Crocetin mit dem Bixin und den Lipochromfarbstoffen (Carotin u. dgl.) verwandt. Das Spaltungsprodukt des Gardenia-Farbstoffs soll mit Crocetin identisch sein.

Alle drei Crocetine zeigen die Blaufärbung, die auch der Safran mit konz. Schwefelsäure gibt.

Die Farbe des Safrans ist außer durch das wasserlösliche Crocin durch tief orangefarbene Chromatophoren bedingt, deren Farbstoff nicht in Wasser übergeht.

[1]) T. F. Hanausek, Über Folia Coriariae, Pharm. Post., 1892, XXV, S. 1342.

[2]) α-Crocin ist der Digentiobioseester des α-Crocetins. β- und γ-Crocetin sind Kunstprodukte und bestehen aus Methyl- und Äthylester des α-Crocetins. P. Karrer u. A. Helfenstein, Helv. chim. Acta, 1930, XIII, S. 392.

Crocin kommt in den Narbenschenkeln von Crocus sativus L. vor, und zwar, wie Molisch (Histochemie, 1891, S. 57) bei Crocus vernus fand, wahrscheinlich im Zellsaft gelöst. Beim Absterben der Zellen durchdringt der Farbstoff Plasma und Zellwände. Zur Untersuchung läßt man die Droge, frisches Material ist nicht leicht zur Hand, einige Stunden an der Luft oder in einer feuchten Kammer liegen. Betrachtet man Präparate in Öl, dann sieht man gelbliche Membranen und Zelllumina, die von einer homogenen gelbrötlichen Substanz völlig erfüllt sind (die Chromatophoren sind selten gut zu erkennen und treten erst an Alkoholmaterial deutlicher hervor). Man kann auch in Anilin einlegen. Der Farbstoff löst sich in beiden Flüssigkeiten nicht, in Anilin erst beim Kochen. Von Molisch wurden die Reaktionen mit Schwefelsäure und mit Salpetersäure (blau, schließlich gelb) empfohlen. Doch wendet man gegenwärtig weitere Reaktionen an, besonders bei der Prüfung des Safranpulvers auf seine gebräuchlichen Verfälschungen. Tschirch und Oesterle haben (Anatom. Atlas, S. 93) eine praktische Tabelle hierzu ausgearbeitet, die nebenstehend in gekürzter Form wiedergegeben ist (S. 599). Die Reaktionen, auf dem Objektträger (auf weißer Unterlage) ausgeführt, lassen sich makroskopisch verfolgen. Das betreffende Pulver wird direkt in dem Reagenstropfen mit einem Glasstabe verrührt.

Der Safran gibt ein Mikrosublimat, in dem gelbe ölige Massen verteilt sind aus denen fast farblose Nadeln anschießen.

Crocetin läßt sich im Safran auf verschiedene Weise nachweisen[1]).

1. Man streut Safranpulver auf einen Tropfen Wasser, setzt wässerige Koniinlösung 1 : 1000 zu und erwärmt. Während des Eintrocknens bilden sich tiefgelbe bis 70 μ lange, gerade auslöschende prismatische Nadeln von Anilin-Crocetin.

2. Eine kleine Messerspitze Safranpulver wird auf dem Objektträger mit einem großen Tropfen Wasser 1—2 Minuten erwärmt, alsdann ein gleichgroßer Tropfen weingeistiger Kalilauge zugefügt und das Deckglas aufgelegt. Es scheidet sich zunächst Carotin als kupferrote Tröpfchen ab. Außerdem bilden sich chromgelbe ölige Massen von Crocetin-Kalium, die bereits in ein bis zwei Stunden in zahlreiche gelbe gut ausgebildete Drusen und Sphärite übergehen.

3. Safranpulver wird unter Deckglas in Anilin 2—3 Minuten bis zur Blasenbildung erwärmt. In 10—12 Stunden entstehen zahlreiche dunkelrote, in Rotbraun polarisierende bis 70 μ große Sphärite von Anilincrocetin, die sich allmählich noch vermehren. Sie lösen sich

[1]) O. Tunmann, Über den Nachweis des Crocetins, Apoth.-Ztg., 1916, XXXI, S. 237.

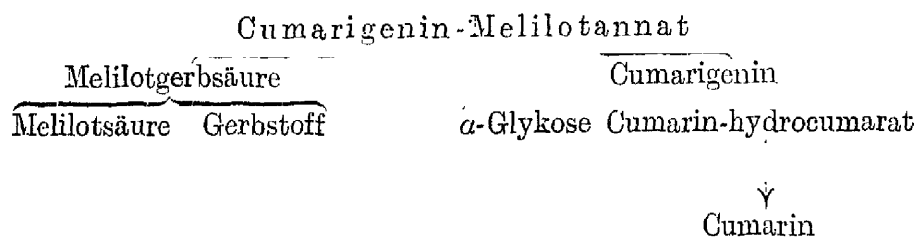
	Konz. Schwefelsäure	Verd. Schwefelsäure (1 + 2)	Konz. Salzsäure	Kalilauge	Ammoniak	Wasser
Crocus	tiefblau — violett — rotbraun — schmutzig braungrün	dauernd orangegelb, Säure gefärbt	orangegelb, Säure dauernd gefärbt	braun, Alkali gelb	orangegelb	tief orangegelbe Lösung
Carthamus tinctorius (Saflor)	rot — sofort orangebraun — brauner Niederschlag	sofort gelb, Säure gelb	gelb, Säure gelb	gelbbraun, Alkali gelb	gelb	gelbe Lösung
Calendula-Blüten	gelb — sofort braunschwarz, Säure braungrün — karminrot — rotbrauner Niederschlag u. Säure entfärbt	unverändert	langsam bräunlich, Säure hellgelb	unverändert, Alkali schwach gelblich	unverändert	unverändert
Curcuma-Wurzel	orangegelb — orangerot — rotbrauner Niederschlag, Säure farblos	Sekretzellen karminrot, Säure farblos	bräunlich, Säure farblos	dauernd tieforange, Alkali gefärbt	rotorange	unverändert, Wasser farblos
Rotes Sandelholz	braunorange — rotbraun — rotbrauner Niederschlag	unverändert, Säure farblos	Säure und Farbstoff unverändert	karminrot, Alkali farblos	karminrot, Alkali farblos	unverändert, Wasser farblos
Campecheholz	kirschrot — orange — brauner Niederschlag	dauernd kirschrot, Säure gefärbt	dauernd kirschrot	blau, Alkali gefärbt, langsam grau	violett — rot — schnell verblassend	blaßrötliche Lösung

langsam in Weingeist und werden auch von Glyzerin angegriffen. Reaktion 3 ist nach Tunmann die beste Reaktion zum Nachweis des Crocetins.

Cumarin-Glykosid

Das Cumarin-Glykosid (Bourquelot u. Hérissey) findet sich in Melilotus officinalis Desr., M. altissimus Thuill. und M. albus Desr. Navez, der fand, daß das Glykosid („Cumarigenin") mit Tannin vergesellschaftet ist, denkt sich seine Zerlegung folgendermaßen.

Cumarigenin-Melilotannat

Melilotgerbsäure		Cumarigenin	
Melilotsäure	Gerbstoff	α-Glykose	Cumarin-hydrocumarat
			↓
			Cumarin

Das Glykosid stellt ein geruchloses weißes flockiges Pulver dar, das aus kleinen prismatischen Kristallen besteht und in Wasser löslich ist.

Navezs[1]) Methode der Lokalisationsermittlung geht aus folgendem Schema hervor:

Frische Schnitte

↓ Ammoniak		↓ Auf ein Tropfen flüssiges Paraffin	Antimon-perchlorid	Ostsche Lösung
Chlorzinkjod an der Luft entfärbt	↓ Destilliertes Wasser mit sofortigem Zusatz von frischem Chlorzinkjod	↓ Joddampf	↓ 33 proz. HCl	Destilliertes Wasser
↓ Frisches Chlorzinkjod		*Glyzerin*	*Glyzerin*	↓ *Glyzerin*

1. Nach Vorbehandlung mit Ammoniak bringt man die Schnitte in destilliertes Wasser, dem man einen Tropfen Chlorzinkjod[2]) zusetzt. Die Glykosidzellen färben sich dunkelbraun, die anderen hell- oder blaßbraun.

Bringt man die Schnitte zunächst in Chlorzinkjod, das eine Stunde der Luft ausgesetzt und entfärbt ist und setzt dann eine Spur des unveränderten Reagens hinzu, so tritt in den Glykosidzellen eine blau-violette Färbung auf. Nach 2—3 Tagen treten in den Zellen Nadelbüschel auf.

[1]) A. Navez, Recherches microchimiques sur la coumarine, Bull. Acad. roy. Belg. Classe des sciences [5], VII, 1922, S. 159.

[2]) Zinkchlorid 20 g, Kaliumjodid 7,5 g, Jod 1,5 g, Wasser 10 g.

2. Man bringt die Schnitte auf einen in einem Uhrglas befindlichen Tropfen Paraffin und setzt sie den Joddämpfen aus, die man aus einigen Jodkriställchen mit Hilfe eines Mikrobrenners aus einen zweiten darunter befindlichen Uhrglas entwickelt.

3. Man bereitet sich eine Ostsche Lösung, indem man 3—5 g Ostsches Pulver (Kaliumkarbonat 50 g, Kaliumbikarbonat 20 g, gepulvertes Kupfersulfat 5 g) in 2—3 ccm Wasser löst. Man bringt zum Sieden und bringt die Schnitte in die siedende Flüssigkeit, der man von Zeit zu Zeit neues Reagens hinzufügt, um den Verdampfungsverlust so zu kompensieren. In den Glykosidzellen tritt Kupferoxydul auf.

Lokalisation bei Melilotus albus und M. altissimus.

Keimling. In Würzelchen und Achse in der Endodermis. In den Kotyledonen in der Epidermis, in einer der unteren Epidermis benachbarten Schicht und einigen angrenzenden Zellen eines Lückenparenchyms, sowie in der Endodermis der Gefäßbündel.

Stengel: Hauptsächlich in der Endodermis und benachbarten Zellen des Rindengewebes, den Markstrahlen, der äußeren Zone des Marks und einigen Markzellen.

Blattstiel. In der Endodermis, weniger in der unteren Epidermis und einigen benachbarten Parenchymzellen.

Blatt. Im Nerven in der Endodermis, besonders der unteren Seite, der unteren Epidermis und dem unter dem Gefäßbündel befindlichen Parenchym; in der Blattfläche hauptsächlich in den unteren Epidermzellen und sehr wenigen Zellen der oberen.

Daphnin

Das 1827 von Vauquelin aufgefundene, dem Aesculin isomere Glykosid Daphnin wird aus dem weingeistigen Extrakte der Rinde von Daphne mezereum dargestellt und bildet farblose Prismen, die in Äther unlöslich, in kaltem Wasser sehr wenig, in heißem Wasser und in kochendem Weingeist leicht löslich sind. Von Alkalien wird das Glykosid mit gelber, von Salpetersäure mit roter Farbe gelöst. Daphninlösung wird von Ferrichlorid bläulich gefärbt. Bei der Hydrolyse mit verd. Säuren oder mit Emulsin entstehen Glykose und Daphnetin (Dioxycumarin, hellgelbe Prismen). Daphnin ist bisher nur in Daphne-Arten angetroffen worden, so in D. mezereum, D. alpina, D. laureola. In D. caucasica (0,5 cm starke Frühjahrszweige) fand Tunmann kein Daphnin.

Da Daphnin sowohl in der Lokalisation und dem zeitlichen Auftreten in den Pflanzenorganen als auch in der Absorption den Oxyflavonglykosiden sehr ähnlich ist, dürfte es wie diese eine wichtige Rolle als Schutz gegen die schädliche Wirkung des kurzwelligen Lichtes spielen (T. Asai[1]).

---

[1]) T. Asai, Über das Vorkommen und die physiologische Bedeutung des Daphnins bei Daphne odora, Acta phytochimica 1930, V, S. 9; Chem. Zentralbl. 1930, II, S. 408.

Die Lokalisation des Daphnins in Daphne mezereum studierte zuerst Sauvan[1]), der Kalilauge (goldgelbe Färbung) und konz. Salpetersäure (orangegelb bis blutrot) gebrauchte. Kalilauge wurde später auch von Goris[2]) benutzt (5,0 Lauge, 50,0 Wasser). Die Einwirkung der Lauge muß sofort verfolgt werden (goldgelbe Färbung), da sich nach kurzer Zeit der ganze Schnitt gelb färbt. Salpetersäure-Ammoniak gibt keine besseren Resultate. In Daphne laureola wurde das Glykosid von Russel[3]) verfolgt. Zur Anwendung kamen außer den genannten Reagentien: Jodjodkalium (orangerote Färbung), Eisensulfat und Phosphormolybdänsäure. Am schärfsten fand Tunmann die Salpetersäurereaktion; sie kann zur Pulverdiagnose von D. mezereum herangezogen werden. Der Inhalt sämtlicher Parenchymelemente wird sofort rot. Die Färbung verblaßt nach einigen Minuten. Die Bastfasern der Daphnearten enthalten kein Glykosid. Die goldgelbe Färbung mit Kalilauge tritt an altem Material und Pulver nicht scharf hervor. Ferrichloridlösung läßt sich an getrocknetem Material nicht verwenden.

Mit Hilfe von Kalilauge einerseits, Jodjodkalium andererseits hat Goris bei Delphinium alpina L., D. gnidium L. und D. laureola L. folgendes über den Sitz des Daphnins festgestellt.

Wurzel: Nur die junge Wurzel enthält ein wenig Daphnin, und zwar in den äußeren Schichten und den Markstrahlen der Rinde.

Stengel: In den ersten beiden Reihen des Phelloderms (besonders in der ersten), einigen Zellen des Rindenparenchyms, besonders in der Nähe des Phelloderms, in den Markstrahlen der Rinde, außerdem in peripheren Zellen des Marks.

Blatt: In allen oberen Epidermiszellen, in Zellen der unteren Epidermis, besonders über dem Hauptnerven, schwach in Palisaden- und Schwammparenchym. Im Mittelnerven kommt Daphnin vor in den Epidermen, der Endodermis, den Markstrahlen und den Zellen der peridesmischen Region.

Blüte: Kelch, Andröceum und Gynöceum enthalten Daphnin in derselben Anordnung wie die Blätter, besonders in der äußeren Epidermis. Man findet es in den Integumenten des ovulums und im nucellus in der Nähe der Chalaza.

In Frucht und Samen hat Sauvan die Lokalisation studiert. Die Früchte enthalten viel Daphnin, und zwar in allen Zellen; die Samen enthalten es in der Samenschale, dem Endosperm und dem Keimling.

---

[1]) L. Sauvan, Rep. de pharm., 1896, S. 55.

[2]) A. Goris, Rech. microchim. sur quelq. glucosides et quelq. tannins végétaux, Paris, Thèse 1903.

[3]) W. Russell, Essai sur la localisation de la daphnine chez le Daphne Laureola, Rev. gén. bot., 1902, XIV, S. 420.

Datiscin

Datiscin, die von Braconnot 1816 isolierte Muttersubstanz des gelben Farbstoffs von Datisca cannabina L. bildet farblose, stark bitter schmeckende seidenglänzende Nadeln oder Blättchen (F. 190°), die in kaltem Wasser fast unlöslich, besser in heißem Wasser und leicht in heißem Weingeist löslich sind. Schwer löslich in Äther. Durch das Enzym Rhamnodiastase wird Datiscin zerlegt in das Xanthonderivat Datiscetin (hellgelbe Nadeln, F. 237°) und Rutinose.

Datiscetin löst sich in konz. Schwefelsäure zu gelber, blau fluoreszierender Lösung.

Zum Studium der Lokalisation benützte Herrmann[1]) die mit Kalk und Barytwasser eintretende Gelbfärbung. Weniger vorteilhaft sind folgende Fällungsreagentien: Bleiazetat (gelb), Zinnchlorür (gelb), Kuprisalze (grünlich), Ferrichlorid (dunkelbraungrün). Goris legt die Schnitte in konz. Kochsalzlösung, die im Innern der Zellen gelbliche Bläschen bildet. Nach den Feststellungen von Herrmann und Goris ergibt sich über die Lokalisation des Datiscins das Folgende:

Wurzel: In den Parenchymzellen der Rinde, des Siebteils und der Markstrahlen.

Stengel: In den Parenchymzellen einer chlorophyllhaltigen, von der Epidermis durch 4 bis 5 Kollenchymreihen getrennten Schicht; ein wenig in der Peripherie des Marks.

Blütenstiel: Im Rindenparenchym, Endodermis, Siebteil und einigen Zellen in der Nähe des Marks.

Blatt: Besonders im Siebteil der Gefäßbündel.

Digitalis-Glykoside

In Digitalis purpurea L. kommt ein Gemisch komplizierter Glykoside vor. Im Blatt treten als wichtigste auf: Digitoxin, Gitoxin, Gitalin, Gitin und mindestens ein Saponin; im Samen: Digitalin und die Saponine Digitonin und Gitonin.

Digitoxin. Tafelförmige Kristalle. F. 252°. Unlöslich in Wasser, löslich in heißem verdünnten Weingeist. Hydrolyse: Digitoxigenin und Digitoxose.

Gibt mit eisenhaltiger Eisessig-Schwefelsäure (9 Teile Schwefelsäure, 1 Teil Eisessig, eine Spur Ferrichlorid) blauviolette Färbung.

Digitalin. Weiße, zu Warzen vereinigte Nädelchen. F. 229°. In reinem Zustand in Wasser schwer löslich, löslich in Weingeist und einem Gemisch von Chloroform und Äther. Hydrolyse: Digitaligenin, Glykose, Digitalose.

[1]) O. Herrmann, Nachweis organischer Verbindungen in vegetabilischen Geweben, Diss. Leipzig, 1876.

Digitonin. Farblose Nadeln oder warzenförmige Gebilde. Sintert (vorgetrocknet) bei 225°. Schwer in Wasser löslich, leichter in Weingeist. Hydrolyse: Digitogenin, Galaktose, l-Xylose. Löst sich in konz. Schwefelsäure mit roter Farbe, die durch Zufließenlassen von Brom stärker wird. Gibt mit weingeistiger Lösung von Phytosterin oder Cholesterin eine in nadelförmigen Büscheln kristallisierende Additionsverbindung (Windaus).

H. Baljet[1]) hat als erster die Lokalisation der Glykoside in den Digitalisblättern studiert. Er verwandte dazu die Orangefärbung, die die Digitalisglykoside mit einer Mischung gleicher Teile einer 10proz. Natronlauge und einer Lösung von 1 g Pikrinsäure in 100,0 95proz. Weingeist geben.

Die Reaktion ist schon mit den reinen Glykosiden nicht sehr charakteristisch und versagt deshalb auch in Schnitten.

Bessere Resultate erhielt Wasicky[2]) mit Tannin. „Setzt man eine 1proz. wässerige Lösung einem Stückchen des lebenden Blattes zu, so dringt sie nur ganz allmählich in die Zellen ein, erst mit deren Absterben. In den Zellen selbst, und zwar in den Epidermis- und Mesophyllzellen entstehen von der Peripherie her unter Kontraktion des Plasma feinkörnige Niederschläge. — In die umgebende Flüssigkeit strömt kein Niederschlag aus. Trocknet man aber vorher das Blatt oder stellt die Reaktion mit der Droge an, dann bilden sich am Rande der Partikelchen von Niederschlagsmembranen umgebene Halbkugeln, die rasch wachsen, um schließlich in kleine Körnchen zu zerstieben. Außerdem dringen zahlreiche Körnchen aus dem Blattstückchen in die umgebende Flüssigkeit ein. Nach den makrochemischen Befunden ist der Niederschlag zum Teil durch die wirksamen Glykoside bedingt. Zieht man kleine Stückchen der Epidermis ab, trocknet Mesophyll und Epidermen gesondert und führt dann die Tanninreaktion durch, so bleibt sie bei den Epidermen fast aus, ist dagegen im Mesophyll überaus deutlich."

Schließlich hat Wasicky noch den physiologischen Versuch herangezogen. Er trennt auf mechanische Weise das Mesophyll von den beiden Epidermen, trocknet an der Luft und bereitet sich ein Extrakt, indem er erst das Material mit 90proz. Weingeist mazeriert, dann den Auszug auf dem Wasserbade bis fast zur Trockene eindampft und den Rückstand

[1]) H. Baljet, Les glucosides digitaliques, Schweiz. Apoth.-Ztg., 1918, LVI, S. 71; Derselbe, Sur la localisation des glucosides actifs dans les feuilles du genre Digitalis. Ebenda S. 248. Vgl. dazu F. Wischo, Über die Baljetsche Identitätsreaktion der Digitalisglykoside, Zeitschr. allg. österr. Apoth.-Ver., 1920, LVIII, S. 189.

[2]) R. Wasicky, Ein Beitrag zur Kenntnis der Pflanzenglykoside, Biochem. Zeitschr., 1921, CXIII, S. 1.

mit 25proz. Weingeist aufnimmt. Die Flüssigkeit wird Wasserfröschen in den Brustlymphsack eingespritzt.

Wasicky fand so, daß die Epidermen mindestens fünfmal schwächer wirken als das Mesophyll. Die Menge der Digitalisglykoside ist von der Assimilation abhängig. Bei ein paar Stunden währender Assimilation steigt die Glykosidmenge zu einem Maximum an. Bei Unterbrechung der Assimilation durch Verdunkelung sinkt die Glykosidmenge.

In den Digitalis-Samen erhielt Fischer mit seinem Blutgelatine-Verfahren überall starke Hämolyse.

Dulcamarin

In Solanum dulcamara hatte Wittstein neben Solanin ein Alkaloid Dulcamarin angegeben. Geissler fand nur ein amorphes Glykosid vor, welches sich leicht in Essigsäure löst und unlöslich in Wasser, Äther und Chloroform ist. — Nach Masson (Bull. scienc. pharm., 1912, XIX, S. 283.) ist Dulcamarin ein Körpergemisch (Dulcamarinsäure, Dulcamaretinsäure und Solacein). Solanin kommt nicht vor. Nach Russell[1]) sollen sich die reagierenden Substanzen zum Herbst in der Wurzel anhäufen.

Molle (Lit. S. 526, 7) hat zum Nachweis des (noch fragwürdigen) Dulcamarins benutzt: Jodjodkalium (hellbraune Tröpfchen), vor allem Schwefelsäure (braunrot, bald kirschrot). In den Auszügen war keine Base enthalten. Da es zweifelhaft ist, ob diese Reaktion sich auf Dulcamarin bezieht, so sei für weitere Einzelheiten auf die Originalarbeit von Molle verwiesen.

Elateringlykosid

In dem Fruchtsafte von Ecballium elaterium A. Rich. tritt ein Glykosid auf (A. Berg), welches bei der Hydrolyse Zucker und Elaterin liefert; letzteres kristallisiert in Täfelchen und Prismen, die sich nicht in Wasser, schwer in Äther, leicht in Alkohol lösen und einige Farbenreaktionen geben.

Braemer (Lit. S. 551, 1) gibt das Glykosid in den Milchsaftbehältern an und wies es nach mit Schwefelsäure (blutrot), Froehdes Reagens (grün, rot), Mandelins Reagens (rot) sowie Phenol-Schwefelsäure (1 + 1, von D. Lindo, Zeitschr. anal. Chem., 1878, S. 500 empfohlen) karminrot.

Die Elemente, in denen Braemer das Glykosid nachgewiesen zu haben glaubte, hält v. Guttenberg[2]) für Siebröhren, die darin eintretende Rotfärbung mit Schwefelsäure hält er für die Raspailsche Reaktion.

[1]) W. Russell, Sur le siège de quelques principes actifs des végétaux pendant le repos hivernal, Rev. gén. de Bot., 1903, XV, S. 160.

[2]) H. v. Guttenberg, Zur Kenntnis des Spritzmechanismus von Ecballium Elaterium Rich., Ber. deutsch. bot. Ges., 1915, XXXIII, S. 20.

Wenn man die Zellen des inneren Fruchtparenchyms plasmolysiert, so treten in ihrem Zellsaft plötzlich größere stark lichtbrechende Kugeln auf, die sich mit Sudan III intensiv rot färben. v. Guttenberg hält sie für das Aglykon des Glykosids.

Flavonglykoside (einschl. Flavone und Flavonole)

Den Anthocyanen und ihren Aglykonen stehen die Flavonglykoside und ihre Aglykone nahe, da die letzteren durch Reduktionsmittel in die Anthocyanidine, die Aglykone der Anthocyane übergeführt werden können. Flavone und Flavonglykoside sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Näheres s. die Arbeit von Klein und Werner[1]).

Die Körper dieser Gruppe (Quercitrin, Rutin, Chrysin, Xanthorhamnin, Apiin u. a. nebst ihren Aglykonen) sind gelbe und braune Stoffe. Die Epidermisflavone kommen von den Gefäßkryptogamen bis zu den letzten Gruppen der Dikotylen vor (v. Lingelsheim).

Der von Combes[2]) in einigen genau lokalisierten Zellen der Blätter von Ampelopsis hederacea nachgewiesene Stoff, der durch Reduktionsmittel einen roten Farbstoff liefert, ist wohl gleichfalls ein Flavon.

Flavone findet man häufig in der Epidermis und im äußeren Parenchym der oberirdischen Teile, in einigen Fällen findet sich davon viel in Rinde und Holz (Myrica rubra, Quercus tinctoria, Morus tinctoria).

Stark belichtete Pflanzen (Alpen- und Tropenpflanzen) sind reich an Flavonen; sie schützen das lebende Plasma gegen die schädliche Wirkung der ultravioletten Strahlen des Sonnenlichts. (Shibata, Nagai, Kishida[3])). Beim Edelweiß enthalten die Filzhaare meist ein Flavon und bilden dadurch einen besonders wirksamen Lichtschirm.

Flavone können bereits im Vegetationspunkt entstehen (Rosaceen, Cuscuta), werden aber meist erst im älteren Gewebe gebildet. Jedes Organ und jedes Gewebe kann Flavone führen. Die stärksten Wandlungen im Flavongehalt voll ziehen sich beim Wechsel der drei Phasen des Wachstums. Als Vorstufe der Flavone können Flavonole auftreten, aus letzteren können Anthocyane entstehen (Klein und Werner).

Die vegetativen Organe anthocyaninbildender Pflanzen enthalten nach Noack (Zeitschr. f. Botanik, XIV, S. 73) ein mit dem Anthocyanin derselben Pflanzen in der Konstitution übereinstimmendes Flavonol.

[1]) G. Klein u. O. Werner, Ein Beitrag zur Physiologie und Verbreitung der Flavone, Zeitschr. physiol. Chem., 1925, CXLIII, S. 9; auch G. Klein, Der histochemische Nachweis der Flavone, Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss. Math. naturw. Kl., 1922, CXXXI, S. 23.

[2]) R. Combes, Untersuchungen über den chemischen Prozeß der Bildung der Anthocyanpigmente, Ber. deutsch. bot. Ges., 1913, XXXI, S. 570.

[3]) K. Shibata u. M. Kishida, Untersuchungen über das Vorkommen und die physiologische Bedeutung der Flavonderivate in den Pflanzen. II. Mitteilg. Ein Beitrag zur chemischen Biologie der alpinen Gewächse, Bot. Mag., Tokyo, 1916, XXIX, S. 301, Ref. Bot. Centralbl., 1916, CXXXII, S. 343.

In der Epidermis, den Palisadenzellen, dem Schwammgewebe, peripheren Rindenzellen sind die Flavone im Zellsaft als Glykoside gelöst; in den Hölzern sollen sie sich hauptsächlich in den Zellmembranen finden, seltener im Zellinnern, dort meist von Gummimassen und anderen Inhaltsstoffen adsorptiv festgehalten, seltener amorph abgeschieden, bei Chlorophora kristallisiert.

Eine mit NH_3 eintretende Veränderung eines Flavonderivats beschreiben Klein und Werner[1]) für Viola lutea: „Eben vollgeöffnete Blüten von Viola lutea werden abgeschnitten und in ein Gläschen mit Leitungswasser gestellt, wobei darauf zu achten ist, daß an den Blütenblättern keine Wassertröpfchen adhärieren. Hierauf wird das Gläschen mit den Blüten für 15—20″ in eine Ammoniakkammer gegeben. Die Blütenblätter werden nach dieser Behandlung tiefgelb erscheinen. Dann überträgt man für 6—8 Stunden in eine feuchte Kammer. Die Blütenblätter erscheinen nach dieser Zeit wieder in ihrer ursprünglichen schwach gelblichen Farbe und haben normales turgescentes Aussehen“[2]). In den Blüten von Viola alba soll das Flavonol durch diese Behandlung vollständig in Flavon übergeführt werden.

Die (Oxy-) Flavone sind in Äther unlöslich, in Weingeist oder Essigsäure zum mindesten in der Wärme löslich. In Ammoniak lösen sie sich mit tiefgelber bis orangegelber Farbe. Mit Ätzbaryt werden sie dunkelgelb bis braun, ohne sich zu lösen. Bleiazetat (weingeistige gesättigte Lösung) fällt, Fehlingsche Lösung und ammoniakalische Silberlösung werden reduziert, weingeistiges Ferrichlorid gibt Farbenreaktionen.

Flavonol führende Gewebe färben sich mit Ammoniakdämpfen gelb (Shibata).

In vielen Fällen kann man aus den flavonführenden Gegenständen die Flavone in kristallinischem Zustand erhalten, wenn man mit Äthylalkohol oder Methanol allein oder in Verbindung mit Alkali, manchmal auch mit Essigsäure behandelt (G. Klein).

Zum allgemeinen Nachweis der Flavone dient das Verfahren von G. Klein, der Salzsäuredämpfe auf die Gegenstände einwirken läßt. Man bringt in die Höhlung eines ausgehöhlten Objektträgers einige Tropfen rauchender Salzsäure, setzt darüber einen 4—6 mm hohen Sublimationsring und auf ihn das Deckglas mit dem Schnitt oder Gewebsstück. Nach ¼stündiger bis ½stündiger Einwirkung bei 40° findet man licht- bis dunkelgelbe Nadeln, Nadelbüschel oder Drusen. Bromwasserstoffsäure erzeugt ebenfalls Kristalle. Die Kristalle lösen

[1]) G. Klein und O. Werner, Ein Beitrag zur Physiologie und Verbreitung der Flavone, Zeitschr. physiol. Chem., 1925, CXLIII, S. 9.

[2]) Klein und Werner glauben, daß das Flavon durch diese Behandlung in eine andere Stufe übergegangen ist, welche mit Anthocyanpseudobase nahe verwandt oder identisch ist.

sich in 1proz. Alkalilauge mit tiefgelber bis oranger Farbe (G. Klein[1]). Die Abscheidung erfolgt an Ort und Stelle, so daß man die ursprüngliche Verteilung vor sich hat.

Zu dunkel gewordene Schnitte hellt man mit Chloralhydrat-HCl (5 Teilen wässeriges Chloralhydrat + 2 Teilen HCl) auf.

Trockene Pflanzen befeuchtet man mit Methanol und benützt sie so zur Reaktion. Man erhält dann meist Drusen im Gewebe und Nadeln oder Nadelbüschel am Rande des Präparats.

Kisser[2]) hat das Kleinsche Verfahren bei flavonführenden Farbhölzern zur Anwendung gebracht. Trockene Proben (Drogen, Pulver) wurden mit Methanol, Äthylalkohol oder Eisessig befeuchtet. Hölzer wurden mit einer Feile fein zerrieben und nach Befeuchtung mit Weingeist oder Eisessig der Einwirkung der HCl-Dämpfe ausgesetzt. Ferner wurden möglichst große Schnitte unter Deckglas mit Weingeist oder Essigsäure heiß ausgezogen und die Präparate in eine mit rauchender Salzsäure beschickte Glasdose gebracht. Nach Eintreten des Farbenumschlags nimmt man sie heraus und läßt bei Zimmertemperatur eintrocknen. Man erhält neben amorphen krümeligen Massen Nadeln, Nadelbüschel oder Doppelpinsel. Kisser macht nähere Angaben über Robinin, Fisetin, und Morin.

Flavon

H. Müller[3]) hat festgestellt, daß das Mehl auf den Blättern, Blütenstielen und Früchten von Primula pulverulenta und anderen Primeln Flavon ist. Es erscheint mit der Entwicklung der Infloreszenz und wird während der Samenreife vermehrt. Brunswik[4]) fand es außer im Mehlstaub-Exkret von 25 Primula-Arten als feste Ausscheidung bei 3 Arten der Gattung Dionysia. Primula sinensis Lindl. und Cortusa Matthioli L. enthalten in ihren flüssigem Drüsenexkret sehr reichlich Flavon.

Die Unterseite der japanischen Primula modesta Bisset et Moore ist mit einem Gemisch von Flavon und 5,6-Dioxyflavon (Primetin) überzogen.

(W. Nogai u. S. Hattori, Konstitution des Primetins, Acta phytoch. 1930, V, S. 1; Chem. Zentralbl. 1930, II, S. 409.)

---

[1]) G. Klein, Der histochemische Nachweis der Flavone, Sitzgsber. Wien. Akad. Wissensch. Math. naturw. Kl., Abt. I, 1922, CXXXI, S. 23.

[2]) J. Kisser, Histochemische Untersuchung einiger flavonführender Farbhölzer, Sitzgsber. Wien. Akad. Wissensch. Math. naturw. Kl., 1922, CXXXI, S. 19.

[3]) H. Müller, The occurence of flavone as the Farina of the Primula, Journ. chem. soc. London, 1915, CVII, S. 872.

[4]) H. Brunswik, Die Mikrochemie der Flavonexkrete bei den Primulinae, Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss. Math. naturw. Kl., Abt. I, 1922, CXXXI, S. 221.

Flavon löst sich leicht in Äther. Es gibt keine Farbenreaktion mit Ferrichlorid und keine Fällung mit (weingeistigem) Bleiazetat. Läßt sich aus heißer konzentrierter Salzsäure umkristallisieren. Die Lösung in konzentrierter Schwefelsäure zeigt blauviolette Fluoreszenz.

Sublimiert in rankenförmigen bis federartigen Kristallbildungen; am Rande auch Einzelkristalle.

Gibt man zu einer Lösung von Flavon in 96proz. Weingeist, die die Hälfte des Raumes zwischen Deckglas und Objektträger einnimmt, so viel Jodjodkalium, daß die andere Hälfte damit ausgefüllt wird, so entsteht ein blauer Niederschlag aus Körnchen und Nadeln, die z. T. büschelig und verfilzt angeordnet sind. Sie sind gegen Wasser und Salzsäure beständig.

Flavonsublimate, die man mit einer jodhaltigen Flüssigkeit betupft, werden infolge Bildung einer Adsorptionsverbindung zuerst violett, dann schwarzbraun bis schwarz.

Quercetin

Quercetin (1, 3, 3′, 4′-Tetraoxyflavonol) kristallisiert in gelben Nädelchen, F. 310° (unter Zers.). Wenig löslich in siedendem Wasser, kaltem Weingeist und Äther, besser in heißem Weingeist. In Alkalien mit gelber Farbe löslich.

Quercetin ist im Pflanzenreich stark verbreitet.

Aus dem Pulver der Podophyllwurzel (vgl. a. S. 367) hat Tunmann[1]), und zwar schon aus 0,01—0,02 g Substanz bei 280—310° Quercetin heraussublimiert. Es sind farblose oder gelbe Kristalle, entweder kurze derbe zugespitzte Nadeln oder sehr lange S- und haarlockenförmige Gebilde, seltener flache linealförmige Gebilde. Die Sublimate lösen sich leicht in kaltem Weingeist und scheiden sich daraus wieder in Form von Drusen und Sphäriten ab. In konz. Schwefelsäure lösen sie sich mit chromgelber, in Salpetersäure mit blutroter (bei Spuren unter dem Mikroskop braunroter) Farbe. Ammonvanadat-Schwefelsäure löst mit olivgrüner, nach längerer Zeit brauner Farbe. Bringt man in einen Tropfen der chromgelben Lösung der Quercetin-Schwefelsäure einen größeren Kristall von Ammonmolybdat, dann wird der Kristall schnell schiefergrün, nach einigen Minuten blau und umgibt sich allmählich mit einer tiefblauen immer größer werdenden Zone.

Quercetin-Glykoside

Glykoside des Quercetins, sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Zu ihnen gehören u. a. das Quercitrin (in der Rinde von Quercus tinctoria und den Blättern von Thuja occidentalis), Isoquer-

[1]) O. Tunmann, Zur Morphologie und Mikrochemie von Podophyllum peltatum L., Pharmaz. Centralbl., 1914, LV, S. 619.

citrin und Quercimeritrin (in den Baumwollblüten) und das in ca. 17 Familien vorkommende Rutin. Über die Lokalisation liegen Angaben nur für das Rutin vor.

Rutin

Rutin bildet hellgelbe schwach glänzende Nadeln, die in kaltem Wasser, Äther, Azeton, Benzol fast unlöslich sind, sich hingegen leicht in kochendem Wasser, Weingeist, Eisessig und Alkalien lösen. Die Lösung in Ammoniak und in ätzenden Alkalien ist gelb, Ferrichlorid färbt Rutinlösung dunkelgrün. Bei der Hydrolyse mit verd. Schwefelsäure wird es in Glykose, Rhamnose und Quercetin gespalten, mit Rhamnodiastase in Quercetin und Rutinose. Rutin wurde u. a. aufgefunden in Aesculus hippocastanum (Blüten), Ruta graveolens, Fagopyrum esculentum (frische Blätter 1,78, frische Blüten 0,71, Stengel 0,09 %), Capparis spinosa (Blütenknospen), Viola tricolor (Violaquercitrin), Sophora japonica (Blütenknospen, Sophorin) u. a.

Über die Verbreitung des Rutins s. I. Gollan, Bull. soc. chim. biol., 1929, XI, S. 1164.

Zum mikrochemischen Nachweis benutzt man Ammoniak oder Kalkwasser, die rutinhaltige Zellen gelb färben. Läßt man die Präparate einige Zeit an der Luft, dann geht die gelbe Farbe in Braun über. Rutin findet sich nur in den Zellen „als Bestandteil des farblosen, flüssigen Zellinhaltes", wie Herrmann[1]) bei Ruta graveolens beobachtete. Bei dieser Pflanze treten die genannten Reaktionen ein: in der Wurzel in zerstreut liegenden dünnwandigen Rindenparenchymzellen, in sämtlichen Zellen der Phloemstrahlen, nur schwach in den Xylemstrahlen und in der Nähe des Kambiums; im unteren stark verholzten Teil des Stengels, außerdem noch in einzelnen Zellen des Markes; im oberen grünen Teil des Stengels im subepidermalen, chlorophyllführenden Gewebe und im Mark; im Blattnerv und im Blütenstiel nicht nur im Parenchym, sondern auch im stark verdickten Hypoderm.

Die Lokalisation des Rutins in Fagopyrum esculentum Moench wurde von Miège[2]) studiert; er bringt die Schnitte zunächst in eine 5proz. Kochsalzlösung und dann in Ammoniak (10 Tropfen Ammoniak, 100 ccm Wasser), Baryt oder Kalkwasser (1 + 2). Er fand das Rutin bei den jungen noch völlig grünen Geweben von Blatt und Stengel in Epidermis, Subepidermis und Endodermis und nur in wenigen Zellen des Parenchyms, immer in Begleitung von Gerbstoff. In den der Sonne ausgesetzten rutinhaltigen Zellen bildet sich bei der Reife ein roter Farbstoff.

[1]) O. Herrmann, Nachweis einiger organischer Verbindungen in den vegetabilischen Geweben. Dissertation Leipzig, 1876, S. 30.

[2]) E. Miège, Recherches sur les principales espèces de Fagopyrum, Thèse Doct. Sciences, Paris, 1910.

Bei Sophora japonica L. gibt der Blütenstiel starke Rutin-Reaktionen im peripheren Teil und im Mark, im Kelch enthalten alle Parenchymzellen Rutin. Im großen ganzen ist die Lokalisation identisch mit der bei Ruta graveolens (Hermann, Goris).

Der Versuch von Pavolini und Meyer (Bull. Soc. Botan. Ital., 1909, S. 81), die Verteilung des Rutins mit Hilfe von Kaliumdichromat und Salzsäure (Dunkelfärbung) zu bestimmen, bedarf der Nachprüfung.

Fustin

Fustin (Chevreul) bildet glänzende Nadeln (F. 218—219°), die sich leicht in heißem Wasser, verdünnten Ätzalkalien und Weingeist lösen und bei der Hydrolyse in Rhamnose (?) und Fisetin (Trioxyflavonol) zerlegt werden. Letzteres stellt gelbliche Nadeln dar, die in Weingeist, Azeton, Essigsäure leicht löslich sind. Fustin kommt als Fustintannid im Kernholze von Rhus cotinus L., R. coriaria, R. rhodanthema und Schinopsis-Arten vor und soll auch in den Blüten von Butea frondosa enthalten sein (?).

Zum Fustinnachweis, der durch den gleichzeitig anwesenden freien Gerbstoff erschwert wird, benutzte Tunmann Salpetersäure. Die damit entstehende Rotfärbung beobachtete er bei einem 0,5 cm starken Zweige im gesamten Parenchym der Rinde, im Holze nur in den Markstrahlen. Vorteilhaft werden die freien Gerbstoffe zum Teil durch Wässern aus den Schnitten möglichst entfernt. Mit Zinnchlorür, Bleiazetat und Kupferazetat tritt eine gelbe Fällung ein, die sich in Essigsäure leicht löst, aber schwer sichtbar ist. Brauchbar ist, besonders an gewässerten Schnitten, die Reaktion mit Ferrichlorid-Natriumkarbonat. Die Schnitte kommen auf 2 Minuten in Ferrichlorid, werden abgespült und in Sodalösung übertragen (rotblaue Färbung). Die Membranen jüngerer Zweige des Holzes geben keine Reaktion.

Goris legt die Schnitte von Rhus Cotinus L. erst 3 bis 4 Sekunden in Sonnenscheins Reagens, dann in Ammoniak und beobachtet die entstehende Rotfärbung sofort. Über den Sitz des Fustins macht er folgende Angaben:

Stengel: Vor allem in den ersten Schichten des Phelloderms, der Endodermis, den Markstrahlen und dem Parenchym der Siebteile. Das Mark ist durch eine Reihe fustinhaltiger Zellen vom Holzteil getrennt.

Blatt: In der Blattfläche gibt die obere Epidermis eine stärkere Fustin-Reaktion, als die untere; es findet sich außerdem im Palisadenparenchym, wenigen Zellen des Schwammparenchyms und der Endodermis der Gefäßbündel. Im Mittelnerven findet sich Fustin ein wenig in allen Parenchymzellen, aber vorzugsweise in den Epidermen, der Endodermis und den dem Holz benachbarten peridesmischen Zellen.

Goris beobachtete Fustin ferner in der dritten oder vierten Schicht der den Sekretbehälter umgebenden Zellen.

Sämtliche Elemente des Fisetholzes sind nach Kisser (l. c., S. 608, 2) in Kanadabalsam tief zitronengelb gefärbt, und führen — besonders die Markstrahlzellen — einen gelblichen bis orangegelben amorphen Inhalt, der durch Alkalien mit orangegelber, orange- bis blutroter Farbe gelöst wird.

Chrysin

In den Knospen von Pappeln.

Hellgelbe, dünne, glänzende Kristalltafeln. F. 275°. Sublimierbar. Unlöslich in Wasser, leicht in Weingeist löslich, schwer in Benzin und Chloroform. In Alkalien mit intensiv gelber Farbe löslich.

Mit Ferrichlorid braunviolett. Mit rauchender Salpetersäure erhält man hellrote, in Alkali mit orangegelber Farbe lösliche Kristalle.

Chrysin wurde von Klein mit Ammoniak-Alkohol in leuchtend dunkelgelben Sphärokristallen erhalten; mit Brom oder Jod erhielt er nach Zusatz von Weingeist am Rande des Präparates hellgelbe Nadeln.

Robinin

In den Blättern von Robinia pseudacacia, ferner in Blättern und Rinde und wahrscheinlich auch im Kernholz (Kisser).

Blaßgelbe Nadeln. F. 196—197°.

Hydrolyse liefert 1 Mol. Galaktose, 2 Mol. Rhamnose und 1 Mol. Kämpferol.

Schnitte durch das Kernholz von Robinia pseudacacia zeigen in Glyzerin die Membranen des Strangparenchyms und der Libriformfasern hellzitronengelb, die Markstrahlzellen hellgelb, Gefäßwände sowie Thyllen schwachgelb angefärbt. In sämtlichen Elementen vereinzelte gelbe Tröpfchen (Gummi), besonders im innersten Teil des Kernholzes.

Saponarin

Saponarin, eine noch wenig erforschte Substanz, soll nach Barger[1]) ein Glykosid sein, der Spaltling soll ein Flavonderivat darstellen. Saponarin ist (neben Narcein) einer der Stoffe, welche ebenso wie die Stärke mit Jod eine Blaufärbung mit Abtönungen von Rot bis Violett geben. Daher wurde mikrochemisch die Reaktion anfangs auf „lösliche Stärke" gedeutet. Doch schon Naegeli[2]) vertrat die Ansicht, daß die Reaktion nicht auf Kohlenhydrate hinweise und Kraus[3]) stellte den Körper zu den Gerbstoffen, da er eine braungrüne Eisenreaktion erhielt.

[1]) G. Barger, Ber. Deutsch. chem. Ges., 1902, XXXV, S. 1296.

[2]) C. Naegeli, Beitr. wiss. Bot., II, S. 187.

[3]) G. Kraus, Abh. naturforsch. Ges., Halle, 1885, XVI, S. 372.

Dufour verdampfte die wässerige Lösung zur Trockne und erhielt Sphärokristalle.

Saponarin ist im Zellinhalte lokalisiert, vornehmlich in der Epidermis. Es kommt vor in Caryophylleen (Saponaria officinalis L., Gypsophila-Arten, Tunica saxifraga Scop.), Cruciferen (Alliaria officinalis), Papilionaceen (Orobus vernus L.)[1]), Malvaceen (Hibiscus syriacus), Sterculiaceen (Cola acuminata, obere Epidermis), Cucurbitaceen (Bryonia dioica), Compositen (Centaurea paniculata), Liliaceen (Gagea lutea, Ornithogalum-Arten), Gramineen (Hordeum-Arten, Bromus erectus), sowie in einem Lebermoos, Madotheka platyphylla[2]) und im Laubmoos Mnium cuspidatum (Kozlowski).

Die Schalen der frischen (nicht alten Samen) von Aesculus hippocastanum geben ein Sublimat von Saponarin (A. Niethammer, Biochem. Zeitschr., 1930, CCXX, S. 356).

Dufour[3]) wies das Saponarin (die „lösliche Stärke") nach, indem er Flächenschnitte von Saponaria officinalis mit Jodtinktur versetzte. Nach dem Verdunsten des Alkohols bilden sich am Deckglasrande teils amorphe blaue Niederschläge, teils sternförmig gruppierte Kristallnadeln. Läßt man Jodreagentien (Jod in Glyzerin, Chloroform, Benzin, Schwefelkohlenstoff, Äther oder Jodjodkalium)[4]) ganz langsam auf Flächenschnitte einwirken, dann bilden sich blaue Kristallnadeln, die meist in, bis 100 μ langen Gruppen vereinigt sind und sich in Alkohol, Wasser, Glyzerin, Säuren und Alkalien leicht, in Äther, Benzin und Chloroform schwer lösen. Ammoniak löst sie unter Gelbfärbung. Mit der Stärke teilt Saponarin die Eigenschaft, daß die blaue Färbung beim Erwärmen verschwindet, um beim Erkalten der Präparate wieder einzutreten. Da Barger (a. a. O.) sein Saponarin nur bei Saponaria officinalis näher studierte, so ist es noch unsicher, ob in allen Fällen der gleiche Körper vorliegt, oder ob wir es mit einer Gruppe ähnlicher Stoffe zu tun haben[5]).

Morin

Morin (1, 3, 2', 4'-Oxyflavon) findet sich in mehreren Farbhölzern, so dem Holze von Chlorophora tinctoria (L.) Gaudich, Morus tinctoria L., Broussonetia

[1]) C. Sanio, Bot. Ztg., 1857, XV, S. 420, J. Dufour, Arch. scienc. phys. et nat. Génève, 1886, XV, S. 437, P. Guérin, Bull. soc. bot., 1897, IV, S. 91.

[2]) H. Molisch, Ber. deutsch. bot. Ges., 1911, XXIX, S. 487.

[3]) J. Dufour, Rech. sur l'amidon soluble et son rôle physiologique chez les végétaux, Bull. Soc. vaudoise des sc. nat., 1886, XXI, Sep.

[4]) Klein verwendete eine Lösung von Jod in Essigsäure.

[5]) Vgl.: A. Fernbach, S. nouv. forme d'amidon soluble, Compt. rend., 1912, CLV, S. 617.

tinctoria Kunth, Artocarpus integrifolia Forst, wahrscheinlich auch in Maclura aurantiaca Nutt. und Morus alba L.

Gelbliche, wenn ganz rein, farblose Nadeln. F. 290°. Löslich in 4000 Teilen kaltem und 1000 Teilen siedendem Wasser; leicht in Weingeist, schwerer in Äther, nicht in Schwefelkohlenstoff löslich. Löst sich in Alkalien, auch Karbonaten mit dunkelgelber Farbe. Charakteristisch ist die gelbgrüne Fluoreszenz, die seine weingeistige Lösung mit Aluminiumsalzen gibt.

Die Lokalisation des Morins ist von Kisser (l. c. S. 608, 2) studiert worden.

Schnitte von Chlorophora erscheinen in Kanadabalsam mehr oder minder gelbbraun gefärbt. Sämtliche Elemente führen Farbstoff. Ebenso Maclura aurantiaca. Im Holz von Artocarpus integrifolia Forst führen die Parenchymmassen besonders reichlichen Inhalt und sind oft von einer in Kanadabalsam leuchtend goldgelb erscheinenden Masse (in Wasser dunkelrotbraun) vollständig erfüllt (Gummimassen).

Xanthorhamnin

Xanthorhamnin ist das Farbstoffglykosid der Früchte mehrer Rhamnus-Arten, besonders von Rhamnus infectoria L. und Rhamnus tinctoria Waldst. et Kit. und kommt auch in mehreren Rinden, so der von Rhamnus purshiana D. C. vor.

Gelbe mikroskopische Nadeln leicht löslich in Wasser und Weingeist, nicht in Äther, Benzol und Chloroform. Enzymatische Hydrolyse liefert Rhamnetin (Methylquercetin) und Rhamninose, letztere wird durch Säuren weiter in Rhamnose und Galaktose gespalten.

Die Gelbfärbung, welche Xanthorhamnin mit Alkalien gibt, ist von Grès[1]) dazu benutzt worden, um seine Lokalisation in der Frucht von Rhamnus infectoria L. festzustellen. Ein sehr verdünnter Ammoniak ergab Gelbfärbung in den Zellen des Perikarps (mit Ausnahme der äußersten, einen violetten Farbstoff enthaltenden Zellen).

Endokarp und Samen enthalten kein Xanthorhamnin.

Ebenso liegen die Verhältnisse in den Früchten von Rhamnus cathartica, caroliniana, azureus, alaternus, saxatilis, utilis. Xanthorhamnin wurde nicht gefunden in den Früchten von Rhamnus californica, Zizyphus vulgaris, Z. chinensis und Paliurus aculeatus.

Diosmin

Das Diosmin (Luteolinmethyläther-Rhamnoglukosid) ist lange Zeit mit Hesperidin verwechselt worden, bis Oesterle u. Wander[2]) zeigten, daß es sich

[1]) L. Grès, Contribution a l'étude anatomique et microchimique des Rhamnées, Thèse Doctorat, Univ. Paris (Pharmacie), 1901.

[2]) Oesterle, O. A., Zur Kenntnis des „Hyssopins", Schweiz. Apoth.-Ztg., LIX, S. 548, 1921; Derselbe, Über den hesperidinähnlichen Bestandteil von

dabei um einen von Hesperidin verschiedenen, wenn auch ihm nahe verwandten Körper handelt.

Das Diosmin stellt, wenn es durch Säuren, auch Kohlensäure, aus alkalischer Lösung ausgeschieden wird, gelblichgraue Sphärokristalle (F. 276⁰—280⁰) dar. Unlöslich in Wasser und Ammoniak (Unterschied von Hesperidin) und auch in den gebräuchlichsten organischen Lösungsmitteln nicht oder nur wenig löslich, letzteres auch in Pyridin und Chinolin. Auch konzentrierte heiße Chloralhydratlösung löst nur wenig.

Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure ergibt Diosmetin (Luteolinmethyläther) (Nadeln F. 255⁰), Glykose und Rhamnose.

Diosmin ist mit Sicherheit festgestellt in den Blättern von Barosma-Arten (Folia Bucco), Blättern und Stengeln von Scrophularia nodosa L., Hyssopus officinalis L., Mentha crispa L., Mentha pulegium L., Hedeoma pulegioides Pers., Conium maculatum L. (auch in den Früchten), Linaria genistifolia Mill. und Capsella bursa pastoris (L.) Mnch. und Toddalia aculeata Pers.

Diosmin wurde von Wander nicht gefunden in den Früchten von Cuminum cyminum L., türkischen Galläpfeln, den oberirdischen Teilen von Galium mollugo L., Lythrum salicaria L., Viola tricolor L., Herba Verbasci, den Blättern von Pilocarpus trachylophus Holm. (Ceara-Jaborandi), Mentha aquatica L., Mentha piperita L., den Blüten von Verbascum phlomoides L. und thapsiforme Schr. und Tilia ulmifolia Scop. und Tilia platyphyllos L. Aus 20 kg oberirdischer Teile von Satureja hortensis L. konnten nur Spuren einer hesperidinähnlichen Substanz gewonnen werden. Es ist zu vermuten, daß noch eine Anzahl der in der Literatur als hesperidinähnliche Substanzen (s. S. 621) beschriebenen Körper als Diosmin erkannt werden.

Über die Konstitution des Hyssopins aus Herba Hyssopi und Capsella bursa pastoris s. R. L. Shriner und E. C. Kleiderer, Journ. Amer. chem. soc. 51, 1267; Chem. Centralbl., 1929, I, 3097.

Mikroskopisch wurde von diesen Kristallvorkommen zuerst die in Capsella bursa pastoris und Scrophularia nodosa gefunden (Mika[1]) 1878), dann das in Conium maculatum (Ad. Meyer[2]) 1882) und im nächsten Jahr das in Hedeoma pulegioides (Borodin) und Hyssopus officinalis (Borodin). 1888 beschrieb Shimoyama[3]) ihr Vorkommen in den Bukko-Blättern, Schulze[4]) 1902 das

Capsella bursa pastoris, ebenda, LX, S. 441, 1922. Oesterle, O. A. u. Wander, G., Pharm. Acta Helv., 1926, I, S. 1. Wander, G., Über das Hesperidin einiger Pflanzen, Promotionsarbeit der Eidgen. Techn. Hochschule Zürich, Bern, 1925.

[1]) Mika, K., Referat in Just. bot. Jahresber., 1878, I, S. 20.

[2]) Meyer, Ad., Anatomische Charakteristik offizineller Blätter und Kräuter Abh. naturf. Ges., Halle, 1887, XV, S. 452, Sep.

[3]) Shimoyama, J., Beiträge zur Kenntnis der Bukublätter, Arch. d. Pharmazie, 1882, CCXXVI, S. 64.

[4]) Schulze, H., Beiträge zur Blattanatomie der Rutaceen, Beih. z. bot. Centralbl., 1902, XII, S. 55.

in Toddalia aculeata. Molisch[1]) entdeckte die Sphärokristalle von Linaria genistifolia, Albertus[2]) die in Mentha pulegium, nachdem Tschirch und Oesterle[3]) sie bereits 1895 für Mentha crispa beschrieben hatten.

Mit dem Diosmin der Blätter dürften die Kristalle identisch sein, die Tunmann[4]) in Blüten und Früchten der Barosma-Arten fand, am meisten in den Fruchtknoten.

In Scrophularia nodosa kommen nach Vogl[5]) die Sphärokristalle nicht nur in den Blättern, sondern auch in der Epidermis und im Rindenparenchym des Stammes vor, weiter noch im Gewebe des Kelchs und der Korolle, dagegen nicht in Wurzel, Holz und Mark.

Die mikrochemischen Reaktionen der in den Bukkoblättern vorkommenden Kristalle sind von Braemer[6]) studiert, mit denen des Hesperidins verglichen und als identisch befunden worden. Hervorzuheben ist folgendes: Bei langem Verbleiben in Essigsäure werden die Kristalle farblos und zeigen deutliche radiale Streifung. Pikrokarmin färbt die Zellwände gelb und die Kristalle rot. Legt man die Blätter oder die abgezogene Epidermis in ein Gemisch gleicher Teile Weingeist und konzentrierter Schwefelsäure, so werden die Kristalle farblos und nehmen die Form von Farnblättern an. Diese Form verschwindet nicht, wenn man mit dem Alkohol-Schwefelsäure-Gemisch oder mit Eisessig kocht, während die ursprünglichen Kristalle beim Kochen mit viel Eisessig in Lösung gehen.

Die Verteilung des Diosmins in den Bukkoblättern wurde von Zenetti[7]) studiert. Legt man Querschnitte in Chloral oder Glyzerin, so löst sich eine äußere Epidermisschicht weitgehend von der inneren. Der schleimhaltige Raum zwischen den beiden getrennten Epidermisschichten ist mit „Hesperidin" von undeutlich kristallinischer Struktur durchsetzt. Löst sich die äußere Hautschicht minder weit von der inneren, so ragen farnblatt-fächerähnliche Gebilde in den Schleim hinein,

[1]) Molisch, H., Über einen leicht kristallisierbaren, organischen Körper bei Linaria-Arten, Ber. deutsch. bot. Ges., 1917, XXIX, S. 99.

[2]) Albertus, H., Das Vorkommen hesperidinartiger Körper in Labiaten, Svensk Farm. Tidskrift, 1919, XXIII, S. 609.

[3]) Tschirch, A. u. Oesterle, O. A., Anatomischer Atlas, 1893, I, S. 76.

[4]) Tunmann, O., Über das Hesperidin und die Kristalle in Hyssopus officinalis L., Pharmaz. Zentralh., 1915, LVI, S. 135.

[5]) A. E. Vogl, Scrophularia nodosa L., Its sphaerocrystals and some allied bodies, Pharm. Journ. and Transact., 1896, [4], II, S. 101; nach Referat in Jahresber. d. Pharmazie f. 1896, XXXI, S. 216.

[6]) L. Braemer, Les réactions histochimiques de l'hespéridine, Association franç. pour l'avancement des sciences, 1893, XXII, S. 482.

[7]) P. Zenetti, Das Vorkommen von Hesperidin in Folia Bucco und seine Kristallformen, Arch. d. Pharmazie, 1895, CCXXXIII, S. 104.

mitunter von der an die Palisaden angrenzenden Querwand der Schleimzellen aus, häufiger von der gegenüberliegenden mit der äußeren Schicht sich ablösenden Wand.

Tunmann[1]) beobachtete Sphärokristalle in den Blüten von Barosma-Arten fast in jeder Epidermiszelle der Blumenblätter, ferner in den meisten Epidermiszellen der Kelchblätter und außerdem in der Fruchtwand.

Bei Hyssopus officinalis fand Tunmann[2]) sie bereits in der Epidermis der Kotyledonen und ihrer Stiele.

Sowohl bei Hyssopus, wie bei den anderen Vorkommen (Mentha, Conium, Capsella bursa pastoris) treten die Diosmin-Kristalle bereits in den jüngsten Blättern auf. Eine Vermehrung tritt normalerweise nicht mehr ein. Deshalb sind ältere Organe scheinbar kristallärmer.

In Linaria genistifolia, bipartita und reticulata[3]) findet sich das Diosmin nach Molisch in den Epidermen der Blätter und des Stengels, ferner in Kelch, Blumenkrone und Stempel, nicht in Wurzel, Samen und Keimlingen. In einer Anzahl anderer Linaria-Arten fand Molisch denselben Körper nicht.

Auch zwei Monate lange Verdunkelung führte bei Mentha und Hyssopus keine Abnahme der Kristalle herbei; selbst in abgefallenen Laubblättern und verwelkten Blüten waren noch die gleichen Kristallmengen zugegen wie vorher. Auch bei Ca- und Fe-Mangel werden die Kristalle nicht wieder in den Stoffwechsel hineingezogen. Befall von Hyssopus durch Pilze bewirkte Vermehrung der Kristalle.

Alle Beobachtungen führen zu dem Schluß, daß das Diosmin (und dasselbe gilt für verwandte Stoffe) kein ausnutzbares Produkt der Zelltätigkeit ist. Sein Vorkommen in der Epidermis läßt vermuten, daß es als Schutzmittel gegen zu intensive Beleuchtung dient; hierfür spricht auch die Beobachtung, daß Zellen, die blauroten Farbstoff (Mentha) führen, in der Regel davon frei sind (Tunmann)[4]).

Fraxin

Fraxin wird aus der Rinde von Fraxinus excelsior L. durch Auskochen mit Wasser gewonnen, bildet farblose Nadeln (F. der bei 130° getrockneten Substanz

[1]) O. Tunmann, Über die Kristallausscheidungen in einigen Drogen (Hesperidin) und über die physiologische Bedeutung dieser Körper, Schweiz. Wochenschr. f. Chem. und Pharmazie, 1909, XLVII, S. 777.

[2]) O. Tunmann, Hyssopus off. L., Zeitschr. allg. österr. Apoth.-Ver., 1906, XLIV, S. 419.

[3]) Der betreffende Stoff ist bei L. bipartita und reticulata nicht makrochemisch untersucht, dürfte aber Diosmin sein.

[4]) O. Tunmann, Über einen neuen Körper in von Pilzen befallenen Hyssopus-Pflanzen, Pharmazeut. Post, 1917, L, S. 773.

205°), die sich schwer in Wasser, wenig in kaltem Alkohol und in Äther, leicht in heißem Wasser und in heißem Alkohol lösen und sich mit Emulsin oder beim Kochen mit verd. Schwefelsäure in Glykose und Fraxetin (Methoxy-Aesculetin, kleine Täfelchen, F. 228—229°) spalten. Fraxin ist gefunden worden in Stamm- und Wurzelrinde von Fraxinus ornus (Dufour), F. excelsior (Salm-Horstmar), Aesculus hippocastanum, A. pavia (Stokes, Rochleder) und in späterer Zeit in Diervilla lutea, D. japonica[1]) (Charaux, 1911). v. Lingelsheim[2]) fand (1916), daß die Anwesenheit fluoreszierender Stoffe in der Rinde ganz bestimmte Verwandtschaftskreise in der Gattung Fraxinus auszeichnet. Nach Russell[3]) soll es sich zur Winterszeit in den basalen Teilen des Stammes und in der Wurzel anhäufen (Diervilla lutea im Winter bis 3 % in der Wurzelrinde).

Fraxin ist durch die blaugrüne Fluoreszenz seiner Lösung, besonders der schwach alkalischen ausgezeichnet.

Zum Studium der Lokalisation verwendete Goris[4]) in erster Linie Kalkwasser. Man läßt die Schnitte bis zu 30 Sekunden in Kalkwasser und bringt sie dann sofort in Glyzerin. Die Fraxin enthaltenden Zellen färben sich gelb.

An zweiter Stelle benützte Goris eine Mischung von zwei Teilen Sonnenscheins Reagens und 1 Teil Wasser. Nachdem man die Schnitte 2 Sekunden darin belassen, bringt man sie in ein Gemisch von 2 Teilen Ammoniak und 1 Teil Wasser, bis Violettfärbung auftritt, wäscht mit Wasser und bringt in Glyzerin. In der Achse von Fraxinus excelsior L. beobachtete Goris das Folgende: Fraxin findet sich reichlich im Phelloderm und im Rindenparenchym, in der Endodermis und den äußersten Zellen des Marks; es findet sich außerdem in Zellen, die innen dem Sklerenchymring anlagern, nicht so stark im Siebparenchym und den Markstrahlen, nicht im Kork.

Die Zellen, die das Fraxin enthalten, führen auch ein Tannid.

Helleborin und Helleborein

In mehreren Arten der Gattung Helleborus kommen die Glykoside Helleborin und Helleborein vor[5]).

Helleborin. Nadelförmige Prismen. F. 269—270°. In Wasser unlöslich. Mit konz. Schwefelsäure hochrot.

Helleborein. Aus Nadeln bestehende Sphärokristalle. Wasserlöslich. Mit konz. Schwefelsäure über braunrot langsam violett.

[1]) Mit der Rinde von D. floribunda erhielt Tunmann ebenfalls einen blau fluoreszierenden wässerigen Auszug.

[2]) A. v. Lingelsheim, Die Fluoreszenz wässeriger Rindenauszüge von Eschen in ihrer Beziehung zur Verwandtschaft der Arten, Ber. deutsch. bot. Ges., 1916, XXXIV, S. 665.

[3]) W. Russell, Sur le siège de quelques principes actifs des végétaux pendant le repos hivernal, Rev. gén. de Bot., 1903, XV, S. 160.

[4]) A. Goris, Recherches microchimiques sur quelques glucosides et quelques tanins végétaux, Thèse Doct. Sc. Paris, 1903.

[5]) Vgl. auch O. Keller, Arch. d. Pharmazie, 1910, CCXLVIII, S. 465 und 1928, CCLXVI, S. 545.

In Helleborus niger L., foetidus L., antiquorum A. Br., lividus Soland., caucasicus A. Br. und pallidus Host. soll das Helleborein das Helleborin überwiegen, das Gegenteil soll der Fall sein bei H. viridis L., orientalis Lam., brevicaulis Jord. et Fours. und caucasicus A. Br. var. germanicus.

Zur Feststellung der Lokalisation wandten Sauvan[1]) und Vanderlinden (l. c. S. 457, 1) konz. Schwefelsäure an, Cuoghi-Constantini[2]) die allgemeinen Kohlenhydratreaktionen mit α-Naphthol- und Thymol-Schwefelsäure. Goris bevorzugt das mit $H_2SO_4 + H_2O$ bereitete Mandelins Reagens. Über die Lokalisation gibt Goris nach Sauvan folgendes an:

Wurzel: Das Helleborein befindet sich, soweit es nachweisbar ist, im Rindenparenchym, das Helleborin ebenfalls in diesem, besonders in der Nachbarschaft des Siebteils.

Rhizom: Beide Glykoside sind an denselben Stellen wie in der Wurzel.

Stengel: Helleborein vorzugsweise in der Epidermis und den subepidermalen Schichten, Helleborin mehr im Rindenparenchym in der Nähe des Siebteils.

Blatt: Im Blattstiel wie im Stengel; in der Blattfläche wurde Helleborein in der Epidermis, besonders der oberen nachgewiesen, außerdem im Chlorophyllparenchym.

Blüte: Kelch- und Blumenblätter, Andröceum und Gynöceum enthalten die beiden Glykoside in allen Zellen. In Kelch- und Blumenblättern ist das Helleborein mehr in den äußeren, das Helleborin in den inneren Teilen.

Samen: Die Samenschale scheint nur Helleborein zu enthalten, das auch weiter die peripheren Gewebe bevorzugt, während das Helleborin vorzugsweise in den mittleren Teilen des Endosperms lokalisiert ist.

In trockenen Querschnitten der Wurzeln von Helleborus viridis und niger erhielt Zawalkiewicz[3]) mit Phosphorwolframsäure einen reichlichen körnigen Niederschlag in allen Rindenparenchymzellen, der auch in der Umgebung des Querschnitts reichlich auftritt. In mit Wasser ausgelaugten Präparaten tritt er nur in Spuren auf. Derselbe Autor gibt noch *folgende* Reaktion an: Man befeuchtet möglichst dünne trockene Schnitte aus trockenen Helleborus-Rhizomen und Wur-

[1]) L. Sauvan, Localisation des principes actifs dans les végétaux, Journ. Bot., 1895, X, S. 160.

[2]) L. *Cuoghi-Constantini*, Nuove *ricerche* sulla *localizzazione* microchimica di alcaloidi e glucosidi in alcune Renonculacee, Atti del Reale Istituto Veneto di science, lettere ed arti, 1911—1912, LXXI, S. 1159.

[3]) Z. Zawalkiewicz, Beiträge zur Anatomie und Mikrochemie der unterirdischen Organe der Gattung Helleborus, Pharmazeut. Post, 1918, LI, S. 753.

zeln mit einem Tropfen Wasickys Reagens und läßt nach drei Minuten einen Tropfen destilliertes Wasser so zufließen, daß die beiden Tropfen sich langsam mischen. Das Parenchym färbt sich schon vor dem Zusatz des Wassers leicht rosa, nach dem Zusatz färbt sich das ganze Parenchym rot, am stärksten unter der Epidermis und außerhalb der Endodermis.

Kohli hat noch folgende Feststellungen gemacht:

Helleborus niger. I. Wurzel. Gesättigte Ammonsulfatlösung erzeugt eine schwache Trübung auf der ganzen Schnittfläche. Mit Brombromwasserstoff entsteht eine körnige Fällung in der Epidermis, der Endodermis, den meisten Parenchymzellen und den Gefäßen. Silikowolframsäure erzeugt eine graubraune Fällung, Uranylazetat eine feinste Granulierung im Parenchym. Nach dreimaligem Auskochen mit 70proz. Weingeist bleibt nur die Trübung mit Ammonsulfat aus; alle anderen Reaktionen treten schwach vermindert ein.

II. Rhizom. Verhalten analog der Wurzel. Die Brombromwasserstoff-Fällung tritt auch in mit Wasser ausgezogenen Schnitten ein.

Helleborus viridis. I. Wurzel. Ammonsulfat: Milchige Trübung im ganzen Schnitt. Brombromwasserstoff: Fällung besonders stark in den Gefäßen. Silikowolframsäure: Graubraune Fällung auf der ganzen Schnittfläche, besonders stark im Phloem. Uranylazetat: Wie oben.

Auskochen mit 70proz. Weingeist schwächt die Reaktionen stark ab.

II. Rhizom. Hervorzuheben ist, daß durch Brombromwasserstoff und Silikowolframsäure starke Fällungen in allen Zellen mit Ausnahme der Epidermis entstehen.

Die mit 70proz. Weingeist ausgekochten Schnitte geben die Reaktionen nur schwach, die mit Wasser ausgezogenen nicht.

Hesperidin[1])

Hesperidin, 1828 ungefähr gleichzeitig von Brandes u. Lebreton aufgefunden, wurde besonders von Tiemann und Will (1881), A. G. Perkin (1898), Power u. Tutin (1907 u. 1910) und Tutin u. Caton (1910) näher erforscht.

Feine mikroskopische Nadeln. F. 251° (unter Zersetzung). Schwer löslich in Wasser und Weingeist, nicht in Äther, Benzol, Chloroform, besser in Essigsäure, leicht mit gelber Farbe in Alkalien. Konzentrierte Schwefelsäure löst mit gelber Farbe, die beim Erwärmen in Rot übergeht.

Hydrolyse durch verdünnte Säuren liefert Hesperetin, Rhamnose und Glykose.

Hesperidin, findet sich nach Pfeffer[2]) in allen Achsen- und Blattorganen von Citrus aurantium Risso, in den Zweigen sowohl im Mark

[1]) Vgl. dazu Diosmin (S. 614) und hesperidinähnliche Körper (S. 621).

[2]) Pfeffer, W., Hesperidin, Botan. Ztg., 1874, XXXII, S. 529.

als im Rindengewebe (anscheinend auch im jungen Holz), und zwar bis dicht unter den Vegetationspunkt; ebenso trifft man es in allen Blütenteilen im Knospenzustande und späterhin und besonders reichlich im Fruchtknoten der Blütenknospe. In der reifen Frucht kommt es in allen parenchymatischen Zellen des Fruchtfleisches und den Zellen der die Fruchtknotenfächer erfüllenden pulpa vor, weiter in den Integumenten der ovula und dementsprechend, wenn auch in geringer Menge, in der Samenschale, während es im Keimling nicht nachgewiesen werden konnte.

Pfeffer fand ferner Hesperidin in den Früchten von Citrus Limetta und in den käuflichen Zitronen, nicht dagegen in den Früchten von Citrus decumana, Bigaradia und Citrus vulgaris Risso.

Außerhalb der Gattung Citrus ist Hesperidin bisher nicht beobachtet worden.

Über die physiologische Funktion des Hesperidins ist nicht Sicheres bekannt. Es ist möglich, daß es ein Schutzmittel gegen zu intensive Beleuchtung ist (Tunmann[1]). Seit Oesterle und Kueny[2]) das Hesperetin in das zugehörige Flavon, den Luteolinmethyläther, übergeführt haben, kommt Hesperidin auch als Zwischenprodukt für die Bildung dieses Farbstoffs in Betracht.

Ausscheidungen von Hesperidin treten in Orangen, Mandarinen und Zitronen erst in den überreifen Früchten in stärkerer Menge auf (A. Niethammer, Biochem. Zeitschr., 1930, CCXX, S. 354).

Mikrochemisch ist eine sichere Unterscheidung zwischen Hesperidin, Diosmin (s. S. 614) und anderen hesperidinähnlichen Kristallen (s. unten) nicht möglich. Über das mikrochemische Verhalten des Hesperidins (s. S. 616).

Hesperidinähnliche Stoffe

Als hesperidinähnliche Stoffe sollen hier solche abgehandelt werden, die das unten näher beschriebene Verhalten zeigen und entweder, soweit die bisherigen Untersuchungen reichen, weder Hesperidin noch Diosmin sind oder überhaupt noch nicht makrochemisch untersucht wurden. Immer handelt es sich um Sphärokristalle, die durch Entziehung von Wasser entstehen, sei es beim Trocknen oder wenn das Material in wasserentziehende Mittel gebracht wird.

Kraus[3]) fand 1872 derartige Kristalle in Cocculus laurifolius, Mika[4]) 1878

[1]) Tunmann, O., Über die Kristallausscheidungen in einigen Drogen (Hesperidin) und über die physiologische Bedeutung dieser Körper, Schweiz. Wochenschr. f. Chem. und Pharmazie, 1909, XLVII, S. 777.

[2]) Oesterle, O. A. und Kueny, R., Über die Beziehung des Hesperidins zu Pflanzenfarbstoffen, Arch. d. Pharmazie, 1915, CCXV, S. 383.

[3]) G. Kraus, Über eigentümliche Sphärokristalle in der Epidermis von Cocculus laurifolius, Jahrb. wiss. Bot., 1872, VIII, S. 421.

[4]) K. Mika, Referat in Just. bot. Jahresber., 1878, I, S. 20.

in Juanulloa und dem Rhizom von Canna virginiana, Ad. Meyer[1]) 1882 in Aethusa Cynapium, Hartwich[2]) 1883 in Quercus-Gallen. Im selben Jahr erschien eine eingehende Arbeit von Borodin[3]), der 3000 Pflanzen untersuchte und in den im folgenden aufgeführten Pflanzen als erster hesperidinähnliche Körper gefunden hat, die er nach ihrem Verhalten gegen Ammoniak als Hesperidin und Pseudohesperidin unterschied. Hesperidin sollte schwer und mit gelber Farbe in Ammoniak löslich sein, Pseudohesperidin leicht und farblos. Die Einteilung kann nicht aufrecht erhalten werden, da, wie schon von Borodin selbst beobachtet und von Tunmann besonders betont wurde, Übergänge zwischen Hesperidin und Pseudohesperidin auftreten und die von Borodin als Hesperidin angesprochenen Stoffe wahrscheinlich nur in wenigen Fällen, vielleicht auch gar nicht mit Hesperidin identisch sein werden.

Hesperidinähnliche Stoffe wurden von Borodin gefunden in:

Ranunculaceae: Coptis trifoliata L., Ranunculus hybridus Bir., Thalictrum simplex L., Th. majus Jacq., Th. aurigeranum Baill. et Timb.

Cruciferae: Capsella rubella Reut.

Caryophylleae: Silene longiflora Ehrh., Dianthus bicolor M. B. Dianthus Squarrosus M. B.

Tiliaceae: Tilia parvifolia Ehrh., Tilia corinthiaca Bosc. (var. rubra, begoniaefolia et ulmifolia).

Linaceae: Linum maritimum L., Linum nervosum.

Papilionaceae: Anagyris foetida L., Cyclopia genistoides Vent., Templetonia angustifolia, Cytisus alpinus Mill., C. argenteus L., Coronilla cretica L., Hedysarum argenteum L., Vicia cracca L., V. hybrida L., V. Orobus DC., V. villosa Roth., V. argentea Lap., V. disperma DC., Sophora alopecuroides L., S. tomentosa L.

Caesalpinieae: Cassia hirsuta L.

Saxifrageae: Chrysosplenium alternifolium L.

Lythrariceae: Lythrum Salicaria L., Lyth. hyssopifolia L., Lyth. Graefferi Ten., Lyth. lineare (Nesaea verticillata H. B. K.).

Umbelliferae: Trinia Kitaibelii M. B., Tr. Henningii Hfn., Athamantha cretensis L., Ath. compacta Ledb. Libanotis montana Cr., L. Candollei Lgc., L. sibirica K., Lomatopodium platyphyllum Schr., Cachrys pterochlona Coss., Crithmum maritimum L., Aethusa Cynapium L., Haloscias scoticum Fr., Callisace da-

[1]) Ad. Meyer, Anatomische Charakteristik offizineller Blätter und Kräuter, Abh. naturf. Ges., Halle, 1882, XV, 452, Sep.

[2]) C. Hartwich, Übersicht der technisch und pharm. verwendeten Gallen, Arch. d. Pharmazie, 1883, CCXXI, S. 822.

[3]) Borodin, Sitzber. d. bot. Sekt. d. Ges. d. Naturf., Petersburg, 1883, nur Russisch; das eingehendste Referat hierüber bei: G. Modrakowsky, Über das Hesperidin in Conium maculatum, Poln. Arch. f. biol. u. med. Wiss., 1905, III, B. Sep. Hier auch der Befund, daß der Schmelzpunkt des Hesperidins bei 270° liegt und nicht, wie Tiemann und Will angeben, bei 251°.

Die Erklärung für diese Unstimmigkeit liegt darin, daß Tiemann und Will Hesperidin untersucht haben, Modrakowsky Diosmin vor sich hatte.

hurica Fisch., Angelica silvestris L., Archangelica officinalis Hfn., Peucedanum arenarium W. et K., Laserpitium hirsutum L.

Rutaceae: Dictamnus Fraxinella L.

Lobeliaceae: Laurentia Michelii DC., Lobelia Cliffortiana L., L. Erinus, L. Kalinii, L. leptostachys DC.

Campanulaceae: Trachelium coeruleum L., Specularia pentagonia DC., S. speculum DC., Adenophora coronopifolia Fisch., A. liliifolia Ledb., A. polymorpha Ledb., Campanula americana L., C. hederacea L., C. pyramidalis L., C. Rainerii Perp., C. uniflora L., C. Waldsteiniana Rchb., C. Zoysii Wulf.

Polemoniaceae: Gilia tricolor, Phlox amoena Sims., Ph. paniculata L., Ph. hybrida.

Scrophularineae: Scrophularia alata Gilib., S. aquatica L., S. biserrata, S. canina L., S. decora Fisch., S. Ehrharti Stev., S. hispida Desf., S. vicularis Moris., S. Scopolii Hoppe, S. vernalis L.

Acanthaceae: Anthacanthus spinosus Nees.

Labiatae: Mentha aquatica L. (var. subspicata Benth.) M. piperita Huds., M. austriaca Jacq., M. Pulegium L., Calamintha Acinos, C. patavina Host., C. suaveolens Boiss., C. thymifolia Rchb., Hedeoma Drummondi Benth., H. pulegioides Pers., Hyssopus officinalis L., Satureja montana L., Thymus capitatus, Bystropogon plumosus, Cunila pulegioides L., Ziziphora clinopodioides Lam., Z. taurica M. B.

Salicineae: Salix acuminata Sm., S. cinerea L., S. grandifolia Ser., S. livida, S. Mielichhoferi Saut., S. nigricans Sm., S. pyrolaefolia Ledb.

„Pseudohesperidin" in:

Anemone stellata Lam., Clematis integrifolia, Ranunculus Thora L., Capparis spinosa L. (var. herbacea et rupestris), Reseda glauca L., Reseda luteola L., Silene dichotoma Ehrh., Dianthus monspessulanus L., Lythrum tribracteatum Salzm., Eutaxia myrtifolia, Aspalanthus callosus, Genista anglica L., G. dalmatica Bartl. C. hirsuta Vahl, C. pilosa L., C. triangularis W., Cytisus nigricans L., C. purpureus Scop., Sarothamnus purgans L., Tephrosia angustissima Schuttl., Ebenus cretica, Kennedya rubicunda et K. monophylla, Parkinsonia aculeata L., Bupleurum angustifolium Ledb., B. aureum Fisch., B. Balansa Boiss., B. canadense Wulfn. B. cernuum Ten., B. falcatum L., B. Gerardi Jacq., B. gracile DC., B. longifolium L., B. ranunculoides L., B. tenuissimum L., Zizia aurea Koch, Flaveria linearis, Saussurea elegans Ledb., Jurinea linearifolia DC., Serratula (Jurinea ?) salicifolia Boiss., Centaurea sempervirens L., Metastelma Bahamense Griseb., et M. Blodgettii Gray., Salix hastata L., Verbena chamaedrifolia, Ranunculus Helenae, R. aconitifolius, Thalictrum Cornuti.

Vogl[1]) fand Sphärokristalle in den Blättern von Pilocarpus trachylophus Holmes und Pilocarpus jaborandi Holmes. Geiger[2]) in denen von Pilocarpus pennatifolius Lem., Schulze[3]) beobachtete sie in den Blättern von Xanthoxylum

[1]) A. Vogl, Über Folia Jaborandi, Zeitschr. österr. Apoth.-Ver. 1896, XL.

[2]) H. Geiger, Beiträge zur pharmakognostischen und botanischen Kenntnis der Jaborandiblätter (Diss. Zürich, 1897).

[3]) Schulze, Beih. z. bot. Centralbl., 1902, XII, Originalarbeiten, S. 55.

fraxineum Willd., Fagara pterota L. (Xanthoxyleae), Dictamnus albus L. (Rutaceae), Calodendron capense, außer in den Blättern verschiedener Barosma-Arten (Diosmeae), wie B. betulinum und serratifolium, die nach Wander (s. S. 614, 2) Diosmin enthalten, in denen von Barosma foetidissimum, divicum, ternatum, venustum, graveolens, oblongum, pulchellum, sowie in den Blättern der zu derselben Familie gehörenden Agathosma biophyllum und Empleurum cusatum, außerdem in Ptelea trifoliata Lam. und Skimmia japonica Thb.

Zu den bereits erwähnten Vorkommen in den Umbelliferen kommen noch weiter hinzu: Trinia glauca Dum. und Seseli libanotis Koch (Nestel)[1]) die Früchte von Cuminum cyminum L., Angelica archangelica L., Ferula angulata und Athamanta cretensis L. (Styger)[2]), ferner durch eine Untersuchung von Nilsson[3]), der in folgenden Arten diese Sphärokristalle fand: Angelica atropurpurea L., A. decurrens Ledb., A. litoralis Fr., A. silvestris L., Bubon galbanum L., Ferula communis L., F. neapolitana Ten., F. scorodosma, Imperatoria ostruth. L., I. hispanica Boiss., Libanotis sibirica C. A. Mey, Ligusticum scoticum L.. Seseli glaucum L., S. tenuifolium Ledb., Trinia vulgaris D. C. In 59 untersuchten Arten konnten keine hesperidinähnlichen Kristalle gefunden werden.

Vogl sah Sphärokristalle in den Haaren der Blumenblätter von Viola tricolor L., den Blättern von Elaeagnus angustifolia L., den Blättern von Vicia faba L.

Unter den Labiaten, in denen bereits Borodin eine Anzahl hierhergehörender Pflanzen gefunden hatte, fand Albertus[4]) noch folgende: Sideritis cretica Boiss., Nepeta kokomeira, Dracocephalum Ruyschiana L., Stachys alpina L., Satureja rupestris, Calamintha off., Mentha sativa L. (M. aquatica + M. arvensis) Mentha viridis L., Mentha candicans, M. candicans var. Eisensteiniana, Mentha silvestris L., Mentha clandestina, Mentha fragrans, Mentha arvensis, Micromeria Douglasii Benth. In 25 Labiaten fand er keine Sphärokristalle. Brunswik[5]), der ebenfalls Labiaten untersuchte, fand im Gegensatz zu Albertus keine Sphärokristalle in Mentha arvensis, dagegen solche in Mentha longifolia Huds., während er in M. spicata L., M. aquatica L. und M. verticillata L. wiederum keine antraf.

Bei den Scrophulariaceen liegen außer den schon früher gemachten Beobachtungen solche über Kristalle in den Staubfädenhaaren von Verbascum vor, die vielfach für Rohrzucker gehalten, von Tunmann[6]) als Hesperidin erklärt wurden. Weiter fand Molisch solche Kristalle in Linaria bipartita und L. reticulata, nicht dagegen in einer Anzahl anderer Linaria-Arten und Antirrhinum

[1]) A. Nestel, Beiträge zur Kenntnis der Stengel- und Blattanatomie der Umbelliferen (Diss. Zürich, 1905).

[2]) J. Styger, Beiträge zur Anatomie der Umbelliferenfrüchte (Diss. Basel, 1919).

[3]) Nilsson, Svensk farmaceutisk tidskrift, 1921, S. 233.

[4]) H. Albertus, Svensk farmaceutisk Tidskrift, 1919, S. 609.

[5]) H. Brunswik, Über neuere Verfälschungen und Verschlechterungen von Drogen, VII. Melissa officinalis L., Zeitschr. allg. österr. Apoth.-Ver., 1920, LVIII.

[6]) O. Tunmann, Über die Kristallausscheidungen in einigen Drogen (Hesperidine) und über die physiologische Bedeutung dieser Körper, Schweiz. Wochenschr. f. Chem. u. Pharmazie, 1909, XLVII, S. 777.

majus. Spuren davon fand Brunswik in frischem Material von Scrophularia alata L. Von den Tiliaceen ist durch Tunmann bekannt, daß bei Tilia ulmifolia Scopoli in den Brakteen, Laubblättern, Blattstielen, Stengeln und Blütenstielen aus frischem Material Sphärokristalle erhalten werden können, nicht bei den Blüten.

Bei den Rubiaceen fand Klein[1]) „Hesperidin" in einem eng zusammengehörenden Kreis von Galium-Arten, nämlich G. rubrum, cristatum, Schultesii, *lucidum, meliodorum, cinereum und mollugo; bei letzterem fand er hesperidinfreie* und hesperidinhaltige Rassen.

Über die Kompositen liegt außer den Angaben von Borodin eine Beobachtung von Edman[2]) vor, der in Anthemis austriaca hesperidinähnliche Kristalle fand.

Vgl. noch P. Gorschboth, Die „Hesperidine" in den Achänen der Kompositen, vornehmlich im Hinblick auf pharmazeutisch wichtige Pflanzen, 1927.

Unter den Monokotyledonen zählt Borodin die Gramineen und Cyperaceen zu den hesperidinführenden Familien. Weiter gehört hierher Anthurium Binotii Linden, in der als einziger unter 14 untersuchten Anthurium-Arten Brunswik[3]) „Hesperidinsphärite" fand. Letzteres Vorkommen ist dadurch bemerkenswert, daß die Kristalle bereits in den lebenden Zellen junger Pflanzenteile nach Beendigung ihres Wachstums auftreten.

Charakteristisch scheint für die hesperidinartigen Körper das scheinbar wahllose Vorkommen; es kann in einer Art reichlich vorkommen und bei den nächsten Verwandten fehlen (Brunswik, 1926); dieses Bild könnte sich allerdings ändern, wenn eingehendere Untersuchungen zeigen würden, daß die Ab- oder Anwesenheit dieser Stoffe noch durch Rassenbildung beeinflußt wird (s. oben).

Die mikrochemische Charakteristik wäre folgende: Hesperidinartige Stoffe sind Glykoside, die in den lebenden Zellen als mehr oder weniger zähflüssige Lösungen vorkommen und sich in den Präparaten frischen Materials bei langsamem Zutritt von Wasser, Weingeist, Glyzerin oder Chloralhydratlösung in Gestalt von gelblichen Sphärokristallen ausscheiden. Die gleiche Kristallform erhält man beim Einlegen größerer Gewebestücke in diese Flüssigkeiten; alsdann finden sich die Kristalle aber nicht mehr am Entstehungsorte. Beim Erhitzen der Präparate in den genannten Reagentien erhält man überwiegend Garben und Büschel farbloser langer Nadeln. Im polarisierten Lichte verhalten sich die Kristalle je nach ihrer Abscheidung verschieden. Bei schnellem Trocknen der Pflanzen (Pressen) scheiden sich die Hesperidine als inulinähnliche Klumpen und Schollen aus, beim langsamen Trocknen an der Luft zersetzen sich einige; diese sind dann in den Drogen nicht

---

[1]) G. Klein, Die Verbreitung des Hesperidins bei den Galieae, Sitzgsber. Wiener Akad. d. Wissenschaften, Abt. I, 1921, CXXX, S. 295.

[2]) Edman, Svensk farmaceutisk tidskrift, 1922.

[3]) Brunswik, Über Hesperidinsphärite im lebenden Hautgewebe von Anthurium Binotii Linden, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1921, XXXIX, S. 208.

immer und nicht so zahlreich zu finden (Tilia); dafür findet sich der abgespaltene Zucker. Hesperidinkristalle sind unlöslich in Wasser, Weingeist[1]), Glyzerin, Äther, Chloroform, Chloralhydrat, verd. Schwefelsäure, verd. und konz. Salz- und Salpetersäure; sie lösen sich sehr schwer und nur bei mehrtägiger Einwirkung in heißem Anilin, Ammoniak und heißer Essigsäure, sind verschieden leicht löslich in Kalk- und Barytwasser, hingegen leicht und mit gelber Farbe in verd. Kali- und Natronlauge. Konz. Schwefelsäure löst mit tiefgelber Farbe. Die Kristalle sind in den Zellen noch erhalten, wenn man größere Gewebestücke längere Zeit im Wasser aufkocht.

Besonderes Gewicht ist darauf zu legen, daß die gelbe Schwefelsäurelösung beim Erhitzen rotbraun wird und daß der Rückstand der Kalilösung bei Zusatz von konz. Schwefelsäure violett wird. Um störende Substanzen auszuschließen (Alkaloide), kann man die Präparate erst mit Weinsäure-Alkohol, Alkohol, heißem Wasser nacheinander behandeln; man bringt dann eine größere Anzahl der Schnitte auf dem Objektträger in einen Tropfen Kalilauge, hebt nach einiger Zeit die Schnitte heraus, läßt die Lösung eintrocknen und fügt Schwefelsäure zu; oder man bringt auf die vorbehandelten Präparate einen Tropfen Schwefelsäure, läßt nach 1—2 Minuten den Tropfen etwas seitwärts von den Schnitten fließen und erhitzt ihn sodann.

Die vielfach untersuchten Kristalle in den Staubfädenhaaren von Verbascum (Fig. 146e) wurden für Glykose gehalten (Senft, Tichomirow). Sie sind aber selbst in heißem Wasser unlöslich und Tunmann sprach sie für Hesperidin an. Doch sind weitere Prüfungen angebracht, denn die Schwefelsäurelösung wird beim Erhitzen nicht rotbraun, auch die Kalilauge-Schwefelsäure-Reaktion tritt nicht in erforderlicher Schärfe ein, worauf Tunmann früher bereits hinwies (Schw. Wchschr. f. Ch. u. Ph., 1909).

Die hesperidinartigen Stoffe und Diosmin sind stets im Zellsaft gelöst und scheiden sich bei Wasserentzug aus. Die Ausscheidung läßt sich an Flächenschnitten (Hyssopus, Capsella, Brakteen von Tilia) an lebendem Material verfolgen. Auf Zusatz von Glyzerin scheiden sich im Zellsaft kleinere und größere stark lichtbrechende Tröpfchen aus, die schnell zu einem großen Tropfen zusammenfließen, der von dem stark plasmolysierten Plasmaschlauch umgeben wird. In 10 Minuten nimmt der Tropfen sphärokristallinische Natur an, während das Zentrum substanzärmer wird und schließlich als kleiner Hohlraum hervortritt. Sphärokristalle aus Herbar- oder Alkoholmaterial sind oft mit einer optisch wenig erkennbaren homogenen Masse umgeben, die bei Einwirkung von Kalkwasser ungelöst zurückbleibt und wahrscheinlich aus

---

[1]) Die sich in Wasser und in Weingeist lösenden Spuren kommen hier nicht in Betracht.

einem Polysaccharid besteht, welches jedoch Fehlingsche Lösung nicht reduziert (Fig. 146c). Erhitzt oder kocht man Präparate lebenden Materials in Wasser, Glyzerin, Chloralhydratlösung oder in verd. Säuren, dann entstehen fast ausschließlich locker angeordnete Kristallbüschel, deren farblose Einzelkristalle als lange Nadeln oder Spieße das ganze Zellumen erfüllen, gewissermaßen die Zellwände durchsetzen.

Untersucht man Pflanzen, die lebend in Weingeist, Glyzerin oder in Wasser eingelegt wurden, dann finden sich die Kristalle nicht nur in der Epidermis, sondern auch im Mesophyll und im Leitparenchym, und zwar sind ganze Strecken kristallfrei, während man anderseits auf Kristallmassen trifft, die eine Gruppe von Zellen völlig erfüllen (Fig. 146b). Diese Ausscheidung rührt daher, daß die Einlegeflüssigkeit die kristallisierbare Substanz auf weite Strecken mitreißt, bis die Lösung so konzentriert wird, daß es in einer Zellgruppe zur Kristallisation kommt. Um sich von der Verteilung des Glykosides eine richtige Vorstellung machen zu können, muß man Schnitte frischen Materials auf dem Objektträger in wenig Alkohol legen, den man langsam verdunsten läßt; es scheiden sich alsdann in jeder Zelle der Epidermis Kristalle aus, einige Zellen führen Kristallsand, andere größere Kristallbüschel. Die Substanz wird gleichsam in verschiedenen Stadien der Kristallisation fixiert (Fig. 146a). Werden die Präparate in viel Wasser oder Alkohol gelegt, dann entstehen überwiegend Sphärokristalle.

Vielfach wird über Abweichungen in den Löslichkeitsverhältnissen der Kristalle berichtet. Diese Angaben sind zum Teil auf die Schleimhüllen zurückzuführen, die das Eindringen der Reagentien verhindern. Mehrfach bestehen indessen kleinere Abweichungen, die es wahrscheinlich machen, daß nicht in allen Fällen die gleiche Substanz, sondern sehr nahe stehende Körper vorliegen. Abweichungen wären bereits durch die verschiedene Zusammensetzung des Zuckers gegeben. Auch die Chemie berichtet über dem Hesperidin nahestehende Körper (Naringin). Daher hatte Tunmann vorgeschlagen, alle die Körper, welche die hauptsächlichsten Hesperidinreaktionen geben und für die eine chemische Analyse noch nicht vorliegt, zu einer Hesperidingruppe zusammenzufassen.

Der bevorzugte Ort dieser Gebilde ist die Epidermis. Hier fanden sie Tschirch und Oesterle bei den Blättern von Mentha piperita (daneben auch im Mesophyll), Mitlacher[1]) in den Blättern und Blüten sehr reichlich im Griffel, bei vielen Arten von Teucrium, Satureja (Brign.) und Mentha, Brunswik in Stengel und Blatt von *Anthurium Binotii*.

[1]) W. Mitlacher, Über einige anatomische Verhältnisse der Labiaten, Zeitschr. allgem. österr. Apoth.-Ver., 1908, XLVI, S. 46.

Styger beobachtete sie in den Früchten von Cuminum cyminum aus Mogador in den inneren Epidermiszellen, in denen von Athamanta cretensis in der äußeren Epidermis und in denen von Angelika Archangelica anscheinend in beiden Epidermen; bei den Früchten von Ferula angulata fand er alle äußeren Oberhautzellen sowie diejenigen der darunter liegenden verdickten Zellreihe — in den Spitzen der Rippen finden sich mehrere Reihen —, dicht angefüllt mit gelben Klumpen und sphärisch angeordneten Kristallen.

Tunmann fand, wenn er Blätter nach seinem Verfahren behandelte, daß die Kristalle niemals im Mesophyll, sondern nur in den Epidermen auftreten, bei bifazialen Blättern vorzugsweise auf der Oberseite, bei zentrischen gleichmäßig auf beiden Seiten; auch bei den oben genannten Teilen von Tilia ulmifolia fand er sie in der Epidermis.

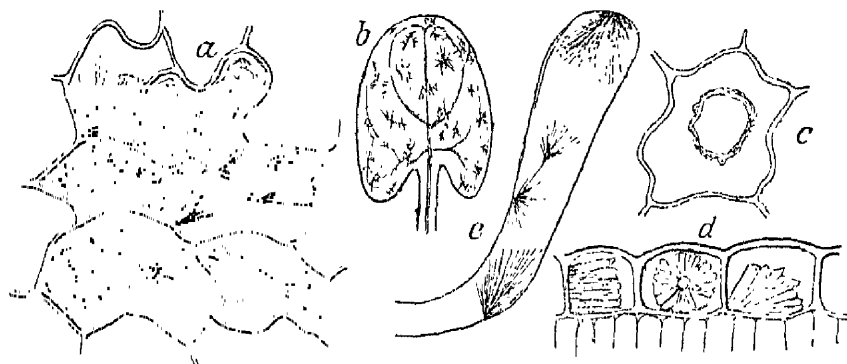



Fig. 146. Diosminkristalle. Hyssopus officinalis, *a*) Blattepidermis, lebend unter Deckglas in Alkohol gelegt, nach dem Verdunsten des Alkohols; *b*) Keimblatt, Alkoholmaterial mit Chloralhydrat aufgehellt, Anhäufung in Zellgruppen; *c*) nach dem Lösen der Kristallsubstanz mit Barytwasser bleibt eine Hüllmasse zurück; *d*) Kristalle der Epidermis, Herbarmaterial; *e*) Hesperidinartige Kristalle. Verbascum, junges Antherenhaar der Knospe, die Verdickungsleisten noch nicht gebildet, in Wasser aufgekocht (Tunmann)

Immer bilden sich diese Stoffe nach Tunmann im Jugendstadium der Zellen. Die spätere Zunahme ist, wenn eine solche überhaupt in allen Fällen stattfindet, normalerweise recht gering. Dagegen kann eine Zunahme unter pathologischen Verhältnissen stattfinden. So berichtet W. Himmelbauer[1]), daß der „Hesperidingehalt" in erkrankten Pflanzen von Mentha piperita und Mentha piperascens, in denen durch Rauchschäden und Puccinien die Tätigkeit des Chlorophyll-Apparates stark herabgesetzt war, stark zunahm.

Bemerkenswert sind dann noch die Angaben von Tunmann (1915), daß die Sphärokristalle von Verbascum und Tilia beim Lagern überwiegend verschwinden (im Gegensatz zu denen von Citrus und Hyssopus) und die damit übereinstimmenden von Klein (1921), der sie bei Galium mollugo var. pycnotrichum im Gegensatz zu den meisten

[1]) W. Himmelbauer, Zeitschr. f. d. landwirtsch. Versuchswesen in Österr., 1914.

anderen Galium-Arten bei langsamem Trocknen gänzlich verschwinden sah.

Da es sich bei der Gruppe der hesperidinähnlichen Körper zweifellos um solche handelt, die verschiedenartige Körper umfaßt, so läßt sich auch ein allgemeines Urteil über ihre physiologische Bedeutung nicht abgeben. Für einen Teil von ihnen dürfte wohl die von Tunmann und Himmelbauer vertretene Ansicht zutreffen, daß sie Exkrete sind. Auch Brunswik reiht die Kristalle von Anthurium Binoti, von denen er feststellte, daß sie in den lebenden Zellen junger Pflanzenteile nach Beendigung ihres Wachstums auftreten, unter die Kristallexkrete im Sinne von Stahl ein.

Indoxylglykosid

Indigo, der blaue Farbstoff, kommt in den Pflanzen, soweit bekannt, nicht vor. Seine Muttersubstanz ist das Indoxyl, das meist in Form des Glykosids Indikan vorkommt. Bei der Hydrolyse mit verdünnten Säuren oder Enzymen spaltet sich Indikan in Indoxyl und Traubenzucker. Indoxyl geht durch Sauerstoff in Indigotin (Indigo) über. Indikan kommt in vielen Pflanzen vor; es seien nur genannt: Indigofera-Arten, Polygonum tinctorium, Nerium tinctorium, Eupatorium indigoferum, Lonchocarpus cyanescens; es findet sich besonders in

Fig. 147. Indirubinkristalle *durch Sublimation aus einem* Indigoziegel erhalten (Pirschle)

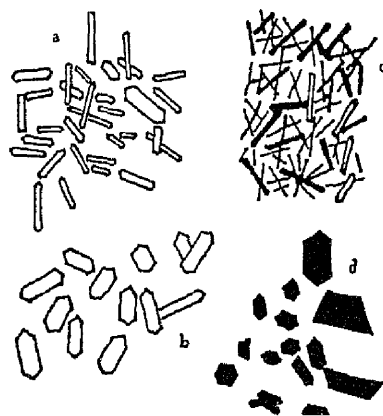



Fig. 148. *Indigotinkristalle durch Sublimation* aus einem Indigoziegel erhalten

einigen Orchideen, Apocynaceen (Echitis religiosa, Wrightia antidysenterica), Asclepiadeen, Acanthaceen, Bignoniaceen, Polygonaceen, Papilionaceen u. a. Sitz des Glykosides sind die Laubblätter, vornehmlich die jungen Blätter; in den Wurzeln findet sich nur wenig Glykosid, in Frucht und Samen fehlt es gänzlich. Im Blatte tritt es in erster Linie in chlorophyllhaltigen Zellen auf.

Erhitzt man Indigo des Handels zuerst langsam, dann stärker bis auf etwa 300°, so tritt zunächst im Sublimat das Indirubin in rot- bis schokoladenbraunen Nadeln auf, die teils vereinzelt, teils in Büscheln

liegen und oft schlangenförmig gekrümmt sind (Fig. 147). In dem danach folgenden Sublimat von Indigotin sind sechsseitige Täfelchen, Stäbchen und stumpfendigende Nadeln charakteristisch (Fig. 148). Man kann die Sublimate aus heißem flüssigem Paraffin umkristallisieren. Indirubin (Fig. 149) gibt dann braune Körnchen und Schollen und bei vorsichtigem Erhitzen sehr charakteristische rote bis rotbraune Doppelpinsel und Nadelbüschel; Indigotin (Fig. 150) gibt blaue lange dünne Nadeln und

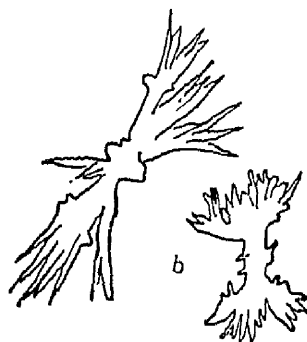



Fig. 149. Indirubin aus heißem Paraffin umkristallisiert (Pirschle)

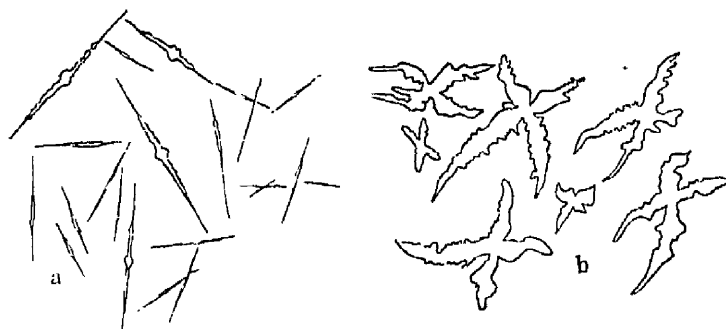



Fig. 150. Indigotin aus heißem Paraffin umkristallisiert (Pirschle)

kreuzförmige Gebilde mit blattartig verbreiterten und gezackten Armen.

Zur Trennung von Indigrot und Indigotin erwärmt man entweder mit 96proz. Weingeist, das reines Indigotin zurückläßt oder mit konz. Essigsäure, mit der man eine reine Lösung von Indirubin erhält (Pirschle)[1].

Wenn man zerriebene getrocknete Stückchen indigoliefernder Pflanzen sublimiert, so erhält man ein Sublimat von Indigotin. Indirubin tritt dabei nach den Beobachtungen von Pirschle nicht auf.

In Isatis tinctoria soll nach Beyerinck Indoxyl vorkommen (Cpt. rend. de la séance de l'académie royale, 30. IX, 1899, S. 91).

[1]) K. Pirschle, Ein Beitrag zur Mikrosublimation des Indigo, Biochem. Zeitschr., 1923, CXXXVI, S. 403.

Zum mikrochemischen Nachweis des Indikans werden nach Molisch frisch gepflückte junge Blätter sofort nach dem Abpflücken in ein etwa 15 cm hohes und 5 cm breites Glasgefäß mit eingeschliffenem Glasstöpsel (sog. Präparatenglas) gebracht, auf dessen Boden ein kleines offenes Gefäß mit Ammoniak oder absolutem Alkohol aufgestellt ist[1]). Die Blätter bleiben etwa einen Tag lang in der Alkohol- oder Ammoniakatmosphäre und werden alsdann auf einen Tag zur Entfernung des Chlorophylls in absoluten Alkohol eingelegt. Ob man Alkohol- oder Ammoniakdämpfe benutzt, muß für jeden einzelnen Fall erst ausprobiert werden. Bei Phajus grandifolius und Calanthe vestita liefert Alkohol, bei Isatis tinctoria Ammoniak die besten Resultate. Bei Benutzung von Chloroformdampf soll sich das entstehende Indigoblau nicht mehr an primärer Lagerstätte vorfinden. Die, aus den vom Chlorophyll befreiten, jetzt blau erscheinenden Blättern hergestellten Präparate werden in konz. wässeriger Chloralhydratlösung (5 : 2) untersucht. Farblos erscheinen die Gefäßbündel, nahezu farblos die Epidermis, während das Mesophyll und die Schließzellen blau sind. Bei näherer Betrachtung erkennt man winzige Körnchen von Indigoblau, die den Chlorophyllkörnern auf- und eingelagert sind. Nur wenig Indigokörnchen finden sich im übrigen Zellinhalt des Mesophylls, noch weniger in der Epidermis und in Trichomen. Da das Indigoblau sich ganz überwiegend im Chlorophyllkorn zeigt, so schließt Molisch[2]), daß das Indikan seinen Hauptsitz im Chlorophyllkorn hat. Beijerinck[3]) ist aber der Ansicht, daß Indikan im Cytoplasma auftritt und daß nur die spaltenden Enzyme in den Chlorophyllkörnern vorkommen. In den abgetöteten Zellen würde Indikan in die Chlorophyllkörner eindringen können und dort von den Enzymen gespalten werden.

Der Indigogehalt der einzelnen Zellen läßt sich auch in folgender etwas zeitraubender Weise ermitteln (Leake)[4]): Kleinere Gewebestücke werden in einer Fixierungsflüssigkeit (bestehend aus 2 ccm Eisessig, 1 ccm konz. Schwefelsäure, 100 ccm Wasser und 0,5 g Ammoniumpersulfat) mehrere Stunden hindurch mazeriert. Die Stücke dürfen nur so groß sein, daß sie von der Flüssigkeit in 6 bis höchstens 12 Stunden völlig durchdrungen sind. Sie werden 3 bis 4 Tage lang in täglich zu

[1]) H. Molisch, Vorkommen und Nachweis des Indikans in der Pflanze, Sitzgsb. Wien. Akad., 8. VI. 1893 und in: J. Wiesner, Rohstoffe des Pflanzenreiches, 1900, I, S. 422.

[2]) H. Molisch, Über das Vorkommen von Indikan im Chlorophyllkorn der Indikanpflanzen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1899, XVII, S. 228.

[3]) M. Beijerinck, Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam, 1900, S. 495.

[4]) H. M. Leake, The localization of the indigo-producing substance in indigo-yielding plants, Annal. of Bot., 1905, XIX, S. 297.

erneuerndem 50 proz. Alkohol gewaschen. Die Dicke der Präparate richtet sich bei den einzelnen Pflanzen nach der Zellengröße. Leake empfiehlt Mikrotomschnitte bei Indigofera von 4 bis 5 μ Stärke, bei Polygonum tinctorium von 8 μ, bei Isatis, Phajus u. a. von 10 bis 12 μ. Nun werden die vom Paraffin befreiten Präparate nach kurzem Abspülen mit Alkohol in verd. Delafieldschen Hämatoxylin (Zusammensetzung s. Zellkern, 50 ccm Lösung + 300 ccm Wasser) wenigstens 12 Stunden gefärbt und schließlich mit Säurealkohol (1 % Salzsäure in 50 % Alkohol) abgewaschen, bis sie nahezu farblos erscheinen. Dann kommen die Schnitte auf eine Stunde in eine 1 proz. Eosinlösung (Grübler), werden mit Alkohol entwässert, in Xylol übertragen und in Kanadabalsam eingebettet.

Neger[1]) weist Indikan in folgender einfacher Weise nach. Man hält ein Blatt der zu prüfenden Pflanze — er verwandte Blätter von Phajus und Calanthe — einige Sekunden lang über die Flamme eines Mikrobrenners oder eines Streichholzes und läßt dann abkühlen. Nach 1—2 Minuten ist dann die vorher erwärmte Stelle von einem dunkelblauen Ring von Indigo umgeben, der besonders deutlich hervortritt, wenn man das Blatt mit Weingeist kocht. Ein Flächenschnitt aus der blauen Zone zeigt nun — besonders nach Zugabe von Schwefelsäure — eine starke Ansammlung von winzigen blauen Indigokristallen.

Unter der Bezeichnung „Pseudoindikan" faßt Molisch[2]) alle Chromogene zusammen, die unter ähnlichen Verhältnissen Farbstoffe liefern, in ihrer Natur aber vom Indigo abweichen. Hierher zählt der Farbstoff in Lathraea squamaria und der, welcher sich beim Absterben der Pflanzen in den Cystolithenzellen verschiedener Acanthaceen bildet. Bei Sanchezia und Goldfussia anisophylla führen nur die Cystolithenzellen der Blätter Pseudoindikan, bei Strobilanthes Deyerianus die Cystolithenzellen aller Organe. Der blaue Farbstoff entsteht erst bei Verletzungen und bildet sich an der Oberfläche der Cystolithen, selten im Plasma. Über Pseudoindikan vgl. noch S. 640.

Anschließend sei an dieser Stelle das chromogene Glykosid erwähnt, welches sich im Stengel und Blatt der brasilianischen Rubiacee Schenckia blumenaviana K. Sch. findet[3]). Blatt und Stengel sind

---

[1]) F. W. Neger, Neue Methoden und Ergebnisse der Mikrochemie der Pflanzen. 1. Eine bequeme Reaktion zum Nachweis von Indigo in Pflanzen, Flora, 1923, N. F., XVI, S. 323.

[2]) H. Molisch, Über Pseudoindikan, ein neues Chromogen in den Cystolithenzellen von Acanthaceen, Sitzgsb. Wien. Akad., 1899, CVIII, $_1$, S. 479.

[3]) H. Molisch, Über ein neues, einen karminroten Farbstoff erzeugendes Chromogen in Schenckia blumenaviana K. Sch., Ber. d. bot. Ges., 1901, XIX, S. 149.

dunkelgrün und nehmen beim Absterben eine rote Farbe an. Auch bei Verwundungen tritt in 1—2 Tagen an der Wundstelle Rotfärbung ein. Die Erzeugung der karminroten Farbe läßt sich an frisch gepflücktem Material mit Chloroformdampf bewirken (wie beim Indikan). Ähnlich wirkt Alkohol, ohne Wirkung ist Ammoniak. Das Chromogen von Schenckia, das auch in der Wurzel vorhanden ist, stimmt mit keinem der bekannten Pflanzenfarbstoffe überein. Durch siedendes Wasser oder heißen Alkohol wird das spaltende Ferment abgetötet, so daß sich die rote Farbe nicht mehr erzeugen läßt.

Ferner sei hier erwähnt der blaue Farbstoff der Früchte von Clerodendron trichotomum Thunb. und der der Narbe der Blüte von Monotropa uniflora L. Beide werden mit Säuren nicht rot (H. Molisch, Pflanzenbiologie in Japan, S. 238).

Den blauen Farbstoff im Arillus von Ravenala madagascariensis hält Schrötter[1]) für Berlinerblau. In Benzol, Chloroform, Karbolxylol, Äther ist der Farbstoff unlöslich. In Bittermandel-, Rizinus-, Terpentin-, Olivenöl sind geringe Mengen löslich. Ammoniak, konz. Schwefelsäure, konz. Salzsäure, Eisessig, Salpetersäure rufen gelbgrüne bis smaragdgrüne Farben hervor. Teile des Arillus entfärben sich bei längerem Liegen in Wasser, nehmen aber beim Trocknen ihre ursprüngliche blaue Farbe wieder an. Da das Gewebe stark eisenhaltig ist und Berlinerblau gegen Reagentien ein gleiches Verhalten zeigt wie der Farbstoff, so wird dieser als Berlinerblau und nicht als Indigoblau angesprochen.

Loganin (Meliatin) und Menyanthin

Loganin ist ein Glykosid, das von Dunstan und Short im Fruchtmus von Strychnos nux vomica L. entdeckt und später von ihnen auch in den Strychnos-Samen aufgefunden wurde. Rosenthaler[2]) hat dann 1923 die Identität dieses Loganins mit dem Meliatin bewiesen, das Bridel 1910 aus dem Bitterklee (Menyanthes trifoliata L.) isoliert hatte. Das Loganin (Meliatin) bildet aus Wasser Prismen, aus Essigäther lange Nadeln (F. 223—224°), die weder durch Bleiessig noch durch Tannin gefällt werden. Schichtet man die wässerige Lösung auf konz. Schwefelsäure, so entsteht an der Berührungszone ein purpurfarbener Ring.

Mit dem Loganin (Meliatin) ist offenbar nicht identisch das von Ludwig und Kromayer 1861 aus Menyanthes trifoliata dargestellte Menyanthin.

Es stellt eine gelbliche amorphe Masse dar, die sich schwer in kaltem Wasser, leicht in heißem Wasser und in Alkohol löst. Die wässerige Lösung gibt mit einigen

[1]) H. Schrötter, Über den Farbstoff des Arillus von Afzelia Cuanzensis Welwitsch und Ravenala Madagascariensis Sonnerat nebst Bemerkungen über den anatomischen Bau der Samen, Sitzgsber. Wien. Ak., 1893, CII, 1. Abt., S. 381.

[2]) L. Rosenthaler, Über Loganin, Schweiz. Apoth.-Ztg., 1923, LXI, S. 398.

Alkaloidgruppenreagentien Niederschläge[1]). Bei der Hydrolyse mit verd. Schwefelsäure spaltet sich das Glykosid in Zucker und Menyanthol, eine nach Bittermandelöl riechende Flüssigkeit, die an der Luft in eine kristallinische Säure übergeht.

An einer etwa 8 Jahre alten Droge (Folia Trifolii fibrini) konnte Tunmann Reaktionen mit keinem der üblichen Reagentien erhalten; an einjähriger Droge traten die Reaktionen auch nur sehr schwach ein. Ein vorheriges Erweichen der Droge in Wasser muß vermieden werden. Nur bei Anwendung mehrerer Schnitte auf einmal traten im Untersuchungstropfen schwache Fällungen ein mit Jodreagentien (gelb), mit Kaliumquecksilberjodid (grau). Tannin war ohne Wirkung, Froehdes Reagens färbte die Chlorophyllzellen rotbraun. Eine eingehende Untersuchung, die erforderlich ist und die auch die Ausläufer berücksichtigen muß, hat von lebendem Material auszugehen. Im Rhizom (Radix Trifolii fibr.) erhält man mit Jodjodkalium, Kaliumquecksilberjodid und beim Kochen mit verd. Salzsäure nur geringe Fällungen. Kalilauge färbt chromgelb und liefert beim Erwärmen Kristalle, die noch näher zu prüfen sind. Typisch wirkt Schwefelsäure. Nach 5—10 Minuten entsteht im gesamten Parenchym eine starke, dunkelviolette Färbung, die mit Raspailscher Reaktion nicht verwechselt werden kann, einige Stunden bestehen bleibt und dann abblaßt. Saugt man ab, so fließen violette Streifen ab, sowie ein Niederschlag, der teils kleinkörnig ist, teils aus kleinen Kristallen besteht. Letztere sind 3—8 μ lang, teils stumpf endende, teils zugespitzte Nädelchen, die trotz ihrer geringen Größe lebhaft polarisieren.

Glykosid von Mimosa pudica

In Mimosa pudica, und zwar in den reizleitenden Geweben, kommt nach Haberlandt[2]) möglicherweise ein Glykosid vor, über welches jedoch noch nähere makrochemische Angaben fehlen. Schneidet man Stengel oder Blattstiel an, dann tritt eine Flüssigkeit aus, die zu einem kristallinischen Rückstand eintrocknet. Da die Kristalle Fehlingsche Lösung erst beim Erhitzen mit verd. Schwefelsäure reduzieren, so scheinen sie einem Glykoside anzugehören. Die Kristalle (Prismen, Drusen, Sphärite oder dendritische Gebilde) lösen sich in Ferrichlorid rotviolett, in konz. Schwefelsäure gelbgrünlich, beim Erwärmen rotbraun; sie lösen sich ferner leicht in Wasser, schwer in Alkohol, fast gar nicht in Äther. In der wässerigen Lösung bewirken verd. Schwefelsäure oder Salzsäure weiße körnige in Alkohol lösliche Niederschläge, Eisenvitriol eine rostbraune Färbung, Bleiazetat einen voluminösen gelblichen Niederschlag, der sich in Essigsäure löst.

[1]) K. Lendrich, Beitr. z. Kenntnis d. Bestandt. von Menyanthes trifoliata, Arch. d. Pharm., 1892, CCXXX, S. 38.

[2]) G. Haberlandt, Das reizleitende Gewebesystem der Sinnpflanze, Leipzig, 1890, S. 17.

Bose u. Das (Proc. Roy. Soc. 1925, XCVII, S. 290) glauben, daß der aktive Stoff der Mimosa ein reduzierender Bestandteil des Protoplasmas ist; er wird durch Osmiumsäure geschwärzt, ist aber weder ein Fett noch ein Lipoid.

Nach Umrath[1]) ist die reizleitende Substanz in Wirklichkeit unbekannt.

Mnioindican

Als Mnioindican bezeichnet Nestler[2]) eine im Zellsaft von Mnium stellare Reich vorkommende glykosidartige Leukoverbindung. Das Herbarmaterial gibt nach Anfeuchten mit gasförmigem Ammoniak eine Blaufärbung, die gegen Säuren unbeständig ist. Der blaue Farbstoff gibt mit Chloralhydrat einen kristallinischen aus schmutzig-violett gefärbten Nadeln oder knochenähnlichen Gebilden zusammengesetzten Niederschlag, daneben rhombische Täfelchen und Dreispitzkristalle.

Myriophyllin

Myriophyllin nannte Raciborski[3]) eine in Vakuolen auftretende Substanz in den Haaren von Myriophyllum, die in Weingeist, Glyzerin, Kalilauge, konz. Mineralsäuren sich nicht löst und in Chloralhydrat, Ammoniak, Eisessig löslich ist, aber in Vanillinsalzsäure eine kirschrote Färbung annimmt. Nach Pröscher[4]) rufen im Verein mit konz. Salzsäure auch andere Substanzen (Alkohole und Aldehyde) die Reaktion hervor. (Über Farbenreaktionen mit Vanillin-Salzsäure s. a. L. Rosenthaler, Zeitschr. f. analyt. Chem., 1905, XLIV, S. 292). Die Reaktion tritt bei den Haarbildungen der meisten Wasserpflanzen ein. Versuchsobjekte: Ceratophyllum demersum, Nuphar luteum, Rumex aquatilis. Wahrscheinlich ist Myriophyllin ein glykosidischer dem Phloroglucin nahestehender Körper; doch wird Phloroglucin mit Ferrichlorid blauschwarz, Myriophyllin aber rotbraun. Theorin[5]) ist der Ansicht, daß im Myriophyllin, welches er als Exkret auffaßt, ein Gemisch von Schleim, Gerbstoff und einer Phloroglucin-

[1]) K. Umrath, Über die Erregungssubstanz der Mimosoideen, Planta, 1927, IV, S. 812.

[2]) Nestler, Studies from the plant physiol. lab. Charles university, Prague, II, S. 95.

[3]) M. Raciborski, Über die Inhaltskörper der Myriophyllumtrichome, Ber. d. bot. Ges., 1893, XI, S. 348.

[4]) Fr. Pröscher, Untersuchungen über Raciborskis Myriophyllin, Ber. d. bot. Ges., 1895, XIII, S. 345.

[5]) P. G. E. Theorin, Mikrokemiska notiser om trichomer, Arkiv Bot., 1911, X, Sep.

verbindung vorliegt. Die Natur des Gerbstoffes wechselt bei den verschiedenen Pflanzen (Nuphar, Menyanthes, Hottonia). Mit einer frisch bereiteten, wässerigen konz. Chinonlösung wird Myriophyllin rötlich, während der in anderen Zellen des Gewebes auftretende Gerbstoff körnig braunschwarz wird. Raciborski[1]) benutzte in späterer Zeit Dimethylaminobenzaldehyd zum Nachweis.

Nach Janson[2]) bestehen die Kugeln der basalen Zellen der Trichome in der Hauptsache aus einem labilen Eiweißstoff, die der Spitzenzellen aus koaguliertem inaktiv gewordenem Eiweiß. Das Myriophyllin wäre demnach kein chemisches Individuum.

Ononin

Glykosid der Wurzel von Ononis spinosa L. (Reinsch). Farblose, vierseitige Prismen, Nadeln oder Blättchen (F. 235⁰ unter teilweiser Zersetzung). Unlöslich in kaltem Wasser, sehr schwer löslich in heißem, ziemlich leicht in siedendem Weingeist, fast gar nicht in Äther. Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure soll Formonetin und eine Hexose, die mit Alkalien Onospin und Ameisensäure ergeben.

Konz. Schwefelsäure ergibt eine rotgelbe, bald in Kirschrot übergehende Farbe, die mit Braunstein karminrot wird.

Zur Bestimmung der mikrochemischen Lokalisation zog Tunmann[3]) die Schnitte erst mit Wasser aus, um Zucker zu entfernen und legte sie dann in Vanadin-Schwefelsäure. Es entsteht in den Zellen erst eine gelbrote, dann kirschrote Lösung; schließlich treten violette Tröpfchen auf. Tunmann fand Ononin im gesamten Parenchym der Rinde und der anhaftenden Borke, wenig in den abgelösten Borkeschuppen, Spuren in den Markstrahlen des Holzes. Ononin und Onokol (s. S. 269) kommen in den gleichen Zellen vor; sie erscheinen unter dem Mikroskop als Schollen und Klumpen im Inhalt der Parenchymzellen.

Phlorhizin

Das von de Koninck und Stas 1835 aufgefundene Glykosid Phlorhizin (die unrichtige Schreibweise Phloridzin hat sich erst in neuerer Zeit eingebürgert) wird aus der frischen Wurzelrinde von Pirus malus in seidenglänzenden Nadeln erhalten, die bei 148—149⁰ unter Wasserverlust schmelzen; bei 130⁰ tritt Festwerden ein, dann bei 170—171⁰ ein zweites Schmelzen unter Zersetzung. Sie lösen sich leicht in Weingeist und heißem Wasser, schwer in Äther und erst in 1000 Teilen kalten Wassers. Beim Kochen mit verd. Säuren spaltet sich das Glykosid in Glykose

[1]) M. Raciborski, Beiträge zur botanischen Mikrochemie, Bull. de l'Acad. de Cracovie, 1906, S. 553.

[2]) E. Janson, Über die Inhaltskörper der Myriophyllum-Trichome, Flora, 1918, N. F. X, S. 265.

[3]) O. Tunmann, Über Radix Ononidis, Ber. deutsch. pharmaz. Ges., 1914, XXIV, S. 55.

und Phloretin, letzteres wird durch Alkalien in Phlorogluzin und Phloretinsäure gespalten. Phlorhizin findet sich in der Wurzelrinde der Obstbäume und in Blattknospen und Blättern von Pirus malus.

Phlorhizin wird mit Vanadin-Schwefelsäure erwärmt rot bis rotviolett; mit Vanillin-Salzsäure tritt allmählich, offenbar erst nach Eintreten einer Spaltung, Rotfärbung ein. Mit Millons Reagens tritt ein braunroter Niederschlag ein. Ferrichlorid ruft eine blauviolette Färbung hervor.

Die in den Rinden gleichzeitig mit Phlorizin vorhandenen Gerbstoffe stören den Nachweis sehr. Hermann (l. c. S. 329, 2), der als erster die Lokalisation studierte, konnte diese Schwierigkeit nicht überwinden. Goris stützt sich auf die Reaktionen mit Vanillin-Salzsäure und Ferrichlorid, von denen aber die erste zweifelhaft ist, weil sie im Gewebe der Wurzelrinde des Apfelbaums im Gegensatz zum Verhalten des Phlorizins rasch eintritt, also wohl durch Gerbstoff verursacht wird.

Goris[1]) gibt für den Apfelbaum folgende Lokalisation an:

Wurzel: Vor allem im Phelloderm, dann in den Markstrahlen der Rinde und in den dem Kambium benachbarten des Holzes. Siebteile, Kambium und Holzparenchym enthalten beträchtlich weniger.

Stengel: In den jungen Zweigen tritt die stärkste Reaktion im subepidermalen Kollenchym ein, außerdem in einigen Parenchymzellen der Rinde, des Marks und den Markstrahlen, besonders in der Siebröhrenzone. In älteren Zweigen sind die Reaktionen schwächer.

Plumbagin

Plumbagin, aus der Wurzelrinde von Plumbago europaea, nach Greshoff identisch mit dem Ophioxylin der Rinde von Rauwolfia serpentaria (vgl. S. 540), ist ein wenig erforschter Pflanzenstoff, der möglicherweise in der Zelle in glykosidischer Bindung auftritt; er bildet nach Dulong d'Astafort in reinem Zustande gelbe prismatische Kristalle, die sich schwer in kaltem, leicht in heißem Wasser, Alkohol oder Äther lösen.

Mikroskopisch wurde Plumbagin von Herrmann (S. 32 der auf S. 329 gen. Diss.) verfolgt, nach dem es in verschiedenen Plumbagineen auftreten soll, so in Pl. Lharpentae. In dieser und in Pl. europaea fanden sich bei Material aus dem Monat September im Zellinhalte in allen parenchymatischen Zellen (auch Markstrahlen, Phloemparenchym) der Wurzelrinde kleine, gelbe, sternförmig gruppierte Nadeln ausgeschieden. Diese Kristalle lösten sich nicht in Wasser, leicht in Weingeist und Äther mit gelber Farbe und in Alkalien mit intensiv roter Farbe. Bei Zusatz von Alkalien nahmen die Kristalle zunächst „eine blaue Färbung an, persistierten eine Weile und gingen nachher auch in Lösung". „Auf genügenden Zusatz einer Säure, z. B. Essigsäure,

[1]) Goris, Localisation usw., S. 303.

ging nun die rote Färbung des Präparates und der umgebenden Lösung sofort in Gelb über.“ Die Angabe, daß Plumbagin in den unterirdischen Stengelteilen auch „in den stark verdickten Membranen der Bastfasern“ auftreten soll, erscheint zweifelhaft. Der Körper soll ferner in geringer Menge in den Blattnerven vorkommen.

Falls Greshoffs Ansicht über die Identität des Plumbagins mit Ophioxylin zu Recht besteht, wird jedenfalls die Sublimation diagnostisch brauchbare Sublimate liefern.

Glykoside von Polygonatum multiflorum

In Polygonatum multiflorum kommen Glykoside vor, über die wenig Genaues bekannt ist.

Varúak[1]) gibt an, daß die Farben- und Fällungsreaktionen von Polygonarin und Polygonatin denen der Convallaria-Glykoside ähnlich sind. Kohli[2]) hat am Rhizom folgendes festgestellt: Konz. Schwefelsäure färbt die an die Epidermis angrenzenden Teile des Parenchyms und die Elemente der Gefäßbündel — mit Ausnahme der Gefäße selbst — eosinrot. Ähnlich — wenn auch noch stärker ausgeprägt — verläuft die Reaktion mit Wasickys Reagens[3]) (Lösung von 2 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 6 g konz. Schwefelsäure + 0,4 g Wasser). Mit Ferrichlorid enthaltender Schwefelsäure beobachtet man, daß sich zuerst idioblastische Zellgruppen in den äußersten Parenchymschichten karminrot färben; in der Mitte des Rhizoms sind solche Zellgruppen seltener. Mit Silikowolframsäure, Brombromwasserstoff, Ammonsulfat, Tannin, Phosphorwolframsäure, Uranylazetat und Kaliumdichromat treten keine Reaktionen ein.

Populin

Populin (Benzoylsalicin) besteht aus weißlichen, süßschmeckenden Nadeln (F. 180°) von gerader Auslöschung, die sehr schwer in kaltem Wasser (in 2400 Teilen), schwer in kaltem Weingeist und in kochendem Wasser (in 42 Teilen), leicht in Äther, heißem Weingeist und in Eisessig löslich sind. Aus unreinen wässerigen Lösungen kristallisiert es in kleinen unvollkommenen Dreiecken, aus reineren Lösungen in strauchartigen Nadeln. Schwefelsäure löst es mit dunkelroter Farbe.

[1]) S. Varúak, Polygonarin und Polygonatin, Einige Beiträge zur Kenntnis der sich im Polygonatum multiflorum — dem vielblütigen Salomonssiegel — vorfindenden chemischen Verbindungen, Glasnik hrvatsk. prirod društva 1916, XXVIII, S. 1 nach Bot. Centralbl. 1916, CXXXII, S. 494.

[2]) R. Kohli, Beiträge zur chemischen Untersuchung von Urginia Burkeana und Urginia maritima nebst Beiträgen zur mikrochemischen Untersuchung einiger glykosidhaltiger Herzdrogen, Diss. Bern, 1930.

[3]) R. Wasicky, Eine neue sehr empfindliche Farbenreaktion des Atropins, Hyoszyamins und Skopolamins, Zeitschr. analyt. Chem., 1915, LIV, S. 393.

Beim Kochen mit Kalk- oder Barytwasser wird es in Benzoesäure und Salicin, bei der Hydrolyse mit verd. Säuren in Glykose, Benzoesäure und Saliretin, ein Umwandlungsprodukt des Saligenins, zerlegt. Populin ist typisch für P. candicans, P. tremula, P. graeca und P. alba, kommt auch in Salixarten vor (S. purpurea). Es tritt in Rinden, Knospen, Blättern auf, meist in Gemeinschaft mit Salicin. Etiolierte Schößlinge enthalten aber nur Salicin, kein Populin (Weevers). Theorin hält es für einen Reservestoff, da es beim Einstellen abgeschnittener Zweige von P. candicans in Wasser verschwand. Russell fand im Winter Anhäufung in den Wurzeln. In den Pflanzen wird Populin von Populase (?) begleitet, als Endprodukt der Spaltung tritt in der Zelle Catechol auf (Weevers).

In der Pflanze hat Theorin[1]) Populin mit Hilfe von Schwefelsäure verfolgt, die eine dunkelrote Farbenreaktion gibt. Die gleiche Reaktion gibt Salicin, das häufig zugegen sein kann. Nun ist zu bemerken, daß Salicin in 28 Teilen kalten Wassers löslich ist. Man entfernt somit Salicin aus den Präparaten, indem man die Schnitte mit Wasser mazeriert und läßt erst dann Schwefelsäure einwirken. Fehlingsche Lösung wird nicht reduziert. In Auszügen läßt sich Populin neben Salicin nach Hydrolyse durch Kochen mit verd. Salzsäure an dem einen Spaltling, Benzoesäure, nachweisen. Die mit Salzsäure gekochte Flüssigkeit wird neutralisiert, mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherauszug wird eingedunstet, der Rückstand sublimiert und die sublimierte Benzoesäure weiter charakterisiert (Weevers, Lit. S. 313, 2).

Rhamnikosid

Rhamnikosid ist ein in Rinden von Rhamnus-Arten (Rh. cathartica L., Rh. utilis Dcsne.) vorkommendes Glykosid, das die Muttersubstanz des Farbstoffs Lokao ist (Bridel u. Charaux).

Grauweißes geruchloses Pulver aus feinen farblosen Nadeln, deren Lösung in Alkalien (in Wasser ist es sehr wenig löslich) sich an der Luft allmählich violett und blauviolett färbt. Wird durch siedendes Wasser in Rhamnikogenol und Primoverose aufgespalten, diese durch verdünnte Säuren in Glykose und Xylose.

Grès (l. c. S. 614, 1) gibt an, daß dieses Glykosid, für das er Grünfärbung mit Alkalien angibt, die in ursprünglich rotvioletten Zellen eintritt, sich findet:

In den Stengeln von Rhamnus utilis, chlorophora, californica, Deliliana, pumila, caroliniana und saxatilis in den äußeren Zellen des Rindenparenchyms, bei Rhamnus infectoria außerdem in anderen Zellen der Rinde.

In den Früchten von Rhamnus cathartica, chlorophora, caroliniana, Deliliana, californica, utilis, pumila und saxatilis in den äußeren Zellen des Perikarps.

---

[1]) P. G. Theorin, Växtmikrokemiska Studier, Öfversigt af Kongl. Vetenskaps Akadem. Förhandlinger, 1884, Nr. 5, S. 51.

Rhapontin (Rhaponticum)

Glykosid der Rhaponticum-Wurzel von Rheum rhaponticum L.

Weiße Nadeln, die sich bei 215° bräunen und (je nach der Art des Erhitzens) bei 230—236° zu einer dunklen Masse schmelzen. Unlöslich in Benzol, Ligroin, Chloroform, schwer löslich in Äther, leicht in verdünntem Weingeist und verdünntem Azeton. Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure ergibt Rhapontigenin und Glykose.

Zum Nachweis von Rhaponticum-Wurzel (insbesondere in Rhabarber) läßt Wimmer (Pharmaz. Post, 1919, LII, S. 221) das mit Wasser ausgezogene Rhaponticumpulver mit einem Gemisch von 100 Teilen 50proz. wässeriger Kalilauge und 5 Teilen 100 vol. Perhydrol befeuchten. Nach 30 Minuten sind die Rhapontikumteilchen intensiv körnig blau (die Rhabarberteilchen entweder völlig entfärbt oder höchstens orangerosa oder gleichförmig violettrot).

Rhinanthin (Aucubin) und ähnliche Glykoside

Rhinanthin heißt — nach seinem Vorkommen in Rhinanthus-Arten — ein Glykosid, das von Ludwig zuerst in den Samen verschiedener Alectorolophus-Arten gefunden wurde und von dem später festgestellt wurde, daß es mit dem aus den Samen von Aucuba japonica L. isolierten Aucubin identisch ist.

Farblose Nadeln oder Prismen in Rosetten. F. 181°. Leicht löslich in Wasser und Weingeist. Die Lösung wird durch Kochen mit Salz- oder Schwefelsäure blaugrün.

Das Glykosid ist offenbar in der Familie der Scrophulariaceae weit verbreitet und wie das Vorkommen in der Cornacee Aucuba zeigt, nicht auf die Scrophulariaceen beschränkt. Dagegen kann vorläufig nichts darüber ausgesagt werden, ob in den zahlreichen Pflanzen, z. B. aus der Familie der Rubiaceen, deren wässerige Auszüge beim Kochen mit Salzsäure oder Schwefelsäure blaugrün oder blau werden, immer Rhinanthin vorkommt. Molisch[1]) und nach ihm H. Müller[2]) sprechen in diesen Fällen von Pseudoindikan (s. S. 632).

Zum Nachweis verwendet H. Müller die Hydrolyse in mehreren Modifikationen.

1. Fragmente der Pflanze werden in einem Reagensglas mit destilliertem Wasser gekocht. Das Filtrat wird nach Zusatz von 5proz. Salz- oder Schwefelsäure abermals erwärmt. Der nach kurzer Zeit entstehende blaue Farbstoff wird mit Amylalkohol ausgeschüttelt.

[1]) H. Molisch, Das Vorkommen und der Nachweis des Indikans in der Pflanze nebst Beobachtungen über ein neues Chromogen. Sitzgsber. d. Akad. Wissensch. Wien, 1893, CII.

[2]) H. Müller, Der Nachweis und die Verbreitung des Rhinanthins (Pseudoindican), Pharmazeut. Monatsh. 1922, III, S. 149; vgl. auch A. Nestler, Zur Kenntnis des Rhinantocyans, Ber. deutsch. bot. Ges., 1920, XXXVIII, S. 117.

2. Man bringt das Material auf 4—5 Stunden in eine verschließbare Glasdose, in der man konzentrierte Salzsäure verdampfen läßt. Die Pflanzen färben sich blaugrün.

3. Man bringt Schnitte oder Teile der zu untersuchenden Pflanze in eine konzentrierte Chloralhydratlösung, gibt 5—8 Tropfen konz. Salz- oder Schwefelsäure dazu und erwärmt oder läßt 10—12 Stunden stehen: Grünblaue Färbung.

Zur Ermittlung der Lokalisation des Rhinanthins ließ H. Müller Salzsäuredämpfe auf sein Material einwirken. Er fand die stärkste Färbung im Gewebe längs des Gefäßbündelstranges, läßt es aber dahingestellt, ob es sich dabei nicht um eine nachträgliche Adsorption handelt. Müller fand es in unterirdischen Organen, besonders reichlich im Wurzelstock von Lathraea squamaria; im Stengel häuft sich das Glykosid in den Knoten an. Es kommt regelmäßig in den Blättern vor, wo es gegen die Blattspitze hin abnimmt und findet sich in sehr großer Menge in den Kotyledonen; in der Blüte speichern es die Blumenkronenblätter, die Staubgefäße und in noch stärkerem Maße das Gynoeceum. Die größten Mengen finden sich in den Samen.

H. Müller hat dann noch eine Anzahl von Pflanzenteilen gefunden, die mit Salzsäure eine ähnliche Reaktion geben wie Rhinanthin, deren Inhaltsstoff sich von diesem aber dadurch unterscheidet, daß das Spaltungsprodukt nicht in Amylalkohol übergeht und sich mit Laugen nicht in Orange verfärbt. Z. T. handelt es sich dabei um Kristallbildungen. Es handelt sich um folgende: Potentilla argentea Blatt; Neottia nidus avis Stamm; Thesium pratense Blatt; Linaria purpurea; Agrostemma githago Blumenkronenblätter; Ajuga reptans Blatt; Erigeron annuum Blatt; Stachys recta Blatt, Blumenblatt; Stachys palustris Blatt; Dianthus Segnieri Blumenblatt; Epilobium aduatum Blatt; Epilobium angustifolium Blatt; Coronilla Blumenkrone; Aruncus silvestris Blatt; Asperula odorata Blumenblatt; Galium cruciatum, boreale, rotundifolium Blatt, Blumenblatt.

Rubichlorsäure (Asperulosid, Chlorogenin)

Zuerst von Rochleder und Willigk im Krapp nachgewiesen, neuerdings von Hérisséy in *Asperula odorata* und vielen anderen Rubiaceen.

Lange seidenglänzende Nadeln (F. 126—127° korr.). Ziemlich leicht in Wasser löslich, schwer in Weingeist und Essigäther, nicht in Äther. Hydrolyse durch Säuren ergibt Glykose und Asperuligenol; die Flüssigkeit wird grünblau.

Russell[1]) hat die Lokalisation mit Hilfe von verdünnter Schwefelsäure und durch leichtes Erwärmen mit selensäurehaltiger Schwefelsäure studiert. Die Rubichlorsäure enthaltenden Zellen nehmen dann eine schöne grün-blaue Färbung an.

[1]) W. Russell, Recherches expérimentales sur les principes actifs de la garance, Rev. gen. de Bot., 1905, XVII, S. 254.

Die Rubichlorsäure findet sich sowohl in den oberirdischen als in den unterirdischen Organen. Ihr bevorzugter Ort ist der Siebteil; man findet sie aber auch sonst in parenchymatischen Geweben. Viel findet sich im Endosperm der Samen, die Keimpflanzen enthalten mehr in den Kotyledonen als in der plumula.

In den unterirdischen Organen findet sich die Rubichlorsäure in denselben Zellen wie die Ruberythrinsäure; doch sind die Zellen, die an letzterer am ärmsten sind, am reichsten an Rubichlorsäure.

Salicin

Salicin (Leroux, 1830) bildet bitter schmeckende rhombische Nadeln, Blättchen oder säulenförmige Prismen (F. 201°), die sich in Wasser, Weingeist, Eisessig und Alkalien leicht lösen und in Chloroform und Äther unlöslich sind. Die wässerige Lösung wird mit Ferrichlorid braun. Bei der Spaltung durch Emulsin liefert es Traubenzucker und Salicylalkohol (Saligenin, F. 82°), der mit Ferrichlorid eine blaue Farbenreaktion gibt. Salicin ist gefunden worden in vielen Salix- und mehreren Populus-Arten (Knospen von P. pyramidalis, nigra und monilifera).

Erwähnt sei noch, daß Brown[1]) bei der makrochemischen Untersuchung einer Rinde von Salix purpurea folgendes fand: Gesamtgehalt 5,8 %, Innenrinde 11,3 %, Mittelrinde 8 %, Außenrinde 2,5 % Salicin.

Nach Theorin[2]) soll Salicin (S. pentandra) beim Austreiben der Knospen verbraucht werden, eine Ansicht, die Weevers[3]) bestätigt fand, nach dem es in den Blättern am Tage gebildet wird, in der Nacht zum Teil wiederum verschwindet, während in der Rinde die Zunahme an Glykosid in der Nacht stattfindet. Das Endprodukt der Spaltung und Umformung ist Catechol, welches in den Zellen verbleibt und zur Neubildung von Salicin dient. Russell[4]) findet Anhäufung in den unteren Stammteilen und in der Wurzel während des Winters. Im Frühjahr wird es verbraucht.

Der erste Forscher, der sich mit dem Nachweis des Salicins befaßte, war wohl S. Raczinski[5]), der sich konz. Schwefelsäure bediente, wobei eine karminrote Färbung entstand. Das Glykosid sollte in den Zellwänden der Markstrahlen, des Holzes und der Bastfasern lokalisiert

[1]) D. Brown, Note on the location of salicin in willow bark, Pharmaceut. Journ., 1903, LXX, S. 588.

[2]) P. G. Theorin, Pflanzenmikrochem. Studien, Sv. V. A. Öfvers, 1884, Nr. V, S. 51 und: Einige pflanzenmikrochemische Notizen, Sv. V. A. Öfvers, 1885, Nr. V, S. 29.

[3]) Th. Weevers, Unters. üb. d. Glykosidgehalt der Pflanzen in Verbind. mit dem Stoffwechsel, Pharm. Weekbl., 1902, Nr. IX, S. 57.

[4]) W. Russell, Compt. rend., 1904, CXXXIX, S. 1230.

[5]) S. Raczynski, Not. sur la distribution d. la salicine dans les tissus des saules, Bull. d. l. soc. imp. Moscou, 1866, Nr. 3.

sein. Wenig später konnte Boguslawski[1]) die Reaktion nicht bestätigen und J. Babikoff[2]) erhielt zwar mit stark verdünnter Schwefelsäure (1 : 40,0 Wasser) Rotfärbung, aber nicht mit konz. Säure, so daß er zur Ansicht gelangt, daß andere Substanzen die Reaktion bedingen. In neuerer Zeit hat man aber allgemein konz. Schwefelsäure herangezogen und die Rotfärbung stets auf Salicin gedeutet (Theorin[3]), 1884, Tschirch[4]), 1885, Rosoll[5]), 1889). Froehdes Reagens und Vanadinschwefelsäure färben violett. Goris (Lit. S. 602, 2) gebraucht eine Mischung von 2 g selensaurem Natrium und 2 ccm 85proz. Schwefelsäure; nicht zu dünne Schnitte verbleiben 5—10 Minuten in der Mischung und werden dann ohne Abwaschen in Glyzerin übertragen.

In salicinhaltigen Schnitten tritt damit Rotfärbung ein, nicht dagegen bei salicinfreien Salix-Arten (S. Caprea L., viminalis L.) und der ebenfalls salicinfreien Populus nigra L.; bei beiden Kategorien färben sich die Fasern rot (Verholzungsreaktion wohl infolge der Anwesenheit eines Phloroglukotannids).

In Salix alba L. fand Goris folgende Lokalisation:

Junger Stengel. In der ersten und zweiten Schicht des unter der Epidermis gelegenen Kollenchymgewebes — nicht in der Epidermis selbst —, in der Endodermis, in den Markstrahlen und der äußersten Zellreihe des Marks, sehr wenig im Rindenparenchym.

Ältere Stengelrinde. Sie enthält mehr Salicin als die junge Rinde, und zwar besonders viel im Phelloderm, in der Zellregion zwischen den Faserbündeln und den Zellen in der Nähe des Pericykels.

Blatt. Im Mittelnerv in den subepidermalen Kollenchymschichten, der Endodermis, den Markstrahlen und der Peripherie des Marks, sehr wenig in dem Parenchym und den Epidermen. In der Blattfläche sind die Epidermen frei von Salicin; es findet sich in der Hypodermis der Unterseite, im Palisadengewebe und einigen Mesophyllzellen in der Nähe der sekundären Nerven.

Die kritischen Prüfungen von Weevers[6]) lassen nun vermuten,

[1]) Boguslawski, Bull. d. la soc. imp. Moscou, 1869.

[2]) J. Babikoff, Über d. Vorkommen d. Salicins in den Weiden, St. Petersburger Ges., 1874, V, S. 1.

[3]) P. G. Theorin, Pflanzenmikrochem. Studien, Sv. V. A. Öfvers, 1884, Nr. V, S. 51.

[4]) A. Tschirch, Beitr. z. K. d. mechan. Gewebesyst. d. Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1885, XVI, S. 303.

[5]) A. Rosoll, Über d. mikr. Nachw. d. Glyk. u. Alkal. in den vegetabilischen Geweben, 25. Jahrber. d. Gymn. Stockerau.

[6]) Th. Weevers, Die physiologische Bedeutung einiger Glykoside, Jahrb. f. wiss. Bot., 1904, XXXIX, S. 229.

daß die genannten Reaktionen auch durch Phytosterine verursacht werden. Da Emulsin in den unangeschnittenen Zellen keine Spaltung des Glykosides herbeiführt (da es nicht eindringt), so extrahiert man die Gewebe durch Auskochen mit Wasser, läßt das Extrakt nach Abkühlung mit Emulsin versetzt 24 Stunden stehen, schüttelt alsdann mit Äther aus, engt den Ätherauszug ein und erhält im Verdunstungsrückstand den Spaltling des Glykosides, das Saligenin, in Gestalt farbloser Rauten, die stark polarisieren, schief auslöschen und unzersetzt sublimieren. Sie geben mit Bromwasser feine gelbe Nadeln von gerader Auslöschung und mit Kupferazetat in verdünnter alkoholischer Lösung beim Erwärmen bei Zusatz von Ammoniumkarbonat gelbe Tropfen, aus denen sternförmig gruppierte grüne Nadeln anschießen. Fehlingsche Lösung wird weder durch Salicin noch durch Saligenin reduziert. Beim langsamen Trocknen wird ein Teil des Glykosides zersetzt.

Saponine

Als Saponine[1]) bezeichnet man stickstofffreie Glykoside, deren wässerige Lösungen stark schäumen, kratzend schmecken, fein verteilte Substanzen am Absetzen hindern, schwer dialysieren und meist rote Blutkörperchen auflösen; sie sind meist amorph. Bei der Spaltung liefern sie neben Sapogeninen teils Hexosen, teils Pentosen oder Methylpentosen, aber auch Glykuronsäure und Galakturonsäure. Gepulverte Saponine erregen Niesen. Saponine finden sich im ganzen Pflanzenreich verbreitet[2]). Bei Kryptogamen hat man sie noch nicht beobachtet, bei den Monokotylen zeichnet sich die Familie der Liliaceen durch Saponinpflanzen aus. Sie finden sich in ungefähr 70 Familien: Liliaceen, Chenopodiaceen, Caryophyllaceen, Ranunculaceen, Rosaceen, Saxifrageen, Polygalaceen, Zygophyllaceen. Mimoseen, Papilionaceen, Sapindaceen, Rhamnaceen, Araliaceen, Primulaceen, Solanaceen, Sapotaceen, Caprifoliaceen, Compositen u. a. Wahrscheinlich bestehen Zusammenhänge zwischen einzelnen Sapogeninen und Sesquiterpenen.

Die Saponine kommen, im Zellsaft gelöst, in allen Teilen der Pflanzen vor, besonders reichlich in Wurzeln, Rinden und Früchten. Beim Absterben der Zellen scheiden sie sich als amorphe Ballen und Klumpen im Zellinhalte ab, ohne die Membran zu durchtränken. Russell fand Anhäufung der Saponine zur Winterszeit in den unterirdischen Reservebehältern. Nach Weevers[3]) werden sie im Samen der Roßkastanie bei der Keimung verbraucht (Reservestoffe). Sie treten bisweilen in relativ großen Mengen auf, Saponaria off. (Wurzel) 13—15 %, Quillaja sap. (Rinde) 8—9 %, Aesculus hipp. (Kotyledonen) 10 %, Polygala senega (Wurzel) 10 %.

[1]) Näheres s. L. Kofler, Die Saponine, Wien 1927, Verlag von Jul. Springer.

[2]) Über die Verbreitung der Saponine s. Kofler (Anmerkung 1) und L. Rosenthaler, Apoth.-Ztg., 1928, XLIII, Nr. 35.

[3]) Th. Weevers, Die physiologische Bedeutung einiger Glykoside, Jahrb. f. wiss. Bot., 1904, XXXIX, S. 243.

G. Schulek[1]) beobachtete bei Herniaria-Arten, daß das Saponin erst bei der Keimung entsteht und im ersten Laubblatt des Keimlings nachzuweisen ist.

Über die Verteilung der Saponine in der Pflanze während verschiedener Reifestadien s. L. Kroeber, Heil- und Gewürzpflanzen, 1930, XII, S. 131.

Wir verfügen zum mikrochemischen Nachweis über einige Gruppenreagentien, doch erscheint es fraglich, ob sich alle Saponine mit diesen nachweisen lassen. Spezialreagentien fehlen oder sind mikrochemisch noch nicht genügend überprüft. Liegen Herbarpflanzen oder Drogen vor, die zum Schneiden nicht in Wasser aufgeweicht werden dürfen, sondern trocken oder nach dem Liegen in feuchter Kammer geschnitten werden, dann präpariert man zunächst in konzentriertem Glyzerin oder Alkohol (auch in Öl). Die saponinhaltigen Zellen zeigen (bei Anwendung von Weingeist nur, wenn das Saponin in Weingeist unlöslich) amorphe Klumpen oder Schollen, die bei gesteigertem Wasserzusatz zu den Präparaten in Lösung gehen. Umgekehrt kann man bei lebendem Material das Saponin, das übrigens überall dort, wo es in großer Menge auftritt, den Zellsaft zähflüssig macht, durch absoluten Alkohol zur Ausscheidung bringen, wenn es, wie zumeist, darin unlöslich ist. Kristallinische Ausscheidungen sind noch nicht beobachtet worden, aber möglich (Sarsaparillglykoside). Doch wären eingehende Beobachtungen über die Wirkung der Plasmolyse wünschenswert.

Konz. Schwefelsäure gibt mit Saponinen im Gewebe eine charakteristische Farbenreaktion (gelb, dann rot, schließlich violett, A. Rosoll[2]). Die Farbenumschläge treten in verschiedener Zeit ein. Bei der Wurzel von Polygala senega (Radix senegae) werden durch konz. Schwefelsäure (verholzte Membranen grünlich) die Saponinzellen sofort gelb. Erst nach ¼ bis ½ Stunde entsteht eine rote Färbung (die verholzten Membranen sind inzwischen blaugrün geworden), die jetzt bald in Violett übergeht. Bei ganz gelindem Erwärmen tritt die violettrote Farbe sofort ein. In der Senegawurzel sind die Saponine im Parenchym der Rinde, in den Markstrahlen des Holzes und im anormalen Holz lokalisiert (Tunmann)[3]), bei Saponaria officinalis L.

[1]) G. Schulek, Mikrochemische Untersuchung der Herniaria-Arten, Ber. ungar. pharmaz. Gesellsch., 1926, Nr. 3, Ref. Pharmaz. Centr. Halle, 1927, LXVIII, S. 169.

[2]) A. Rosoll, Üb. d. mikrochem. Nachw. d. Glykos. u. Alkal. i. d. vegetabil. Geweb., 25. Jahrber. Gymnas. Stockerau, 1890, S. 11 und: Beiträge z. Histochemie der Pflanzen, Sitzgsber. Wien. Akad., 1884, LXXXIX, 1. Abt., S. 143.

[3]) O. Tunmann, Üb. eine Beimeng. d. Senegawurzel, Pharm. Zentralh., 1908, XLIX, S. 63.

und Gypsophila struthium L. im Parenchym der Mittelrinde, in den Markstrahlen und im Holzparenchym der Wurzeln und Stengel, bei Quillaja saponaria im Parenchym der Mittelrinde (A. Rosoll).

Die Schwefelsäure wird man zuweilen vorteilhaft mit anderen Stoffen verbinden (Ammoniumvanadat, Selenige Säure u. a.) und so abweichende Färbungen erreichen. Da saponinarme Pflanzen die Reaktion nicht in charakteristischer Weise zeigen, es andererseits viele andere Stoffe gibt, die ähnliche Reaktionen geben, so ist die Reaktion natürlich mit Vorsicht zu beurteilen. — Nesslers Reagens (S. 179) gibt in Saponinzellen sofort Niederschläge (Vamvakas). Diese sind so stark, daß das mikroskopische Bild ganz unklar wird. Die Färbung schlägt innerhalb 10 bis 12 Stunden mehrmals um (gelb, rotbraun, grau, schwarz) und ist makroskopisch (beim Halten der Präparate über eine weiße Unterlage) sehr gut sichtbar. Doch kommt Nesslers Reagens als Hilfsreaktion nur bei Abwesenheit von Ammoniumverbindungen, Kohlenhydraten und anderen Glykosiden, in Betracht[1])

Hanausek[2]) übertrug die Lafonsche Digitalinreaktion (Compt. rend. 1885, C, S. 1543, Journ. Pharm. Chim. 1885 [5], XII, S. 126) auf das mikrochemische Gebiet. Die Präparate kommen in ein Gemisch von gleichen Teilen Alkohol und konzentrierter Schwefelsäure. Beim Erwärmen tritt eine rotviolette Färbung in den Saponinzellen auf,

Die Saponine gaben bei einigen Objekten folgende Reaktionen (Hanausek):

	Alkohol-Schwefelsäure		Präparate von b m.verd.Eisenchl.
	a) kalt	b) warm	
Agrostemma gith. (Embryo)	gelbgrün, $+H_2O$ goldgelb	violett	braunblauer N
Dianthus carthus. (Embryo)	gelbgrün	ziegelrot	hellbraun. N.
Sapindus sapon. u. escul. (Perikarp)	keine Färb.	dunkelviolett	bräunl. N.
Saponar. rubr. (Rinde) . . (Holz keine Reakt.)	blaßgelb	rosenrot-violett	rötlich. N.
Sapind. sapon. (Rinde u. Holz)	gelb	rot	in Rinde braun. N
Polygal. senega (Rinde) . (Holz keine Reakt.)	zitronengelb	blutrot-violett	blauer N.
Polygal. major (Wurzelrinde)	goldgelb	blutrot-violett	braunblauer N.
„ amara „	blaßrötlich	violett	braun. N.
Quillaja sapon. (Rinde) .	blaßgelb	rötlich violett	bräunl. N.

[1]) L. Rosenthaler, Das Verhalten von Nesslers Reagens gegen einige Glykoside (speziell Saponin) und Kohlenhydrate, Pharmaz. Zentralhalle, 1906, XLVII, S. 581.

[2]) T. F. Hanausek, Zur Kenntnis des Vorkommens und Nachweises der Saponinsubstanzen im Pflanzenkörper, Chem. Ztg., 1892, XVI, S. 1295.

bisweilen auch nach einiger Zeit in der Kälte. Fügt man einen Tropfen Ferrichlorid (das offizinelle Präparat) hinzu, so bildet sich ein bräunlichblauer Niederschlag. Die Stärke des Niederschlages ist abhängig von der Menge des anwesenden Saponins.

Die angeführten Reaktionen haben den Nachteil, daß Zucker, Gerbstoffe, Alkaloide u. a. mehr oder weniger mit in Reaktion treten können. Bei der Schwefelsäurereaktion tritt der Übelstand hervor, daß mit Zucker und dem plasmatischen Eiweiß die Raspailsche Reaktion zustande kommt. Daher empfahl Rosoll Kontrollschnitte mit Schwefelsäure zu studieren, denen man durch Auskochen mit Wasser die Saponine entzogen hat. Da aber hierbei der Zucker gleichzeitig ausgezogen wird, so nützen die Kontrollschnitte wenig. Bei einiger Übung bieten bereits die Farbenübergänge (gelb, rot, violett), die Zucker-Plasma-Schwefelsäure nicht geben, genügenden Anhalt. Es empfiehlt sich, die Farbenreaktionen makroskopisch zu kontrollieren (Halten der Objektträger über eine weiße Unterlage).

Etwas bessere Resultate liefert die Methode von Combes[1]). Sie ist für Dauerpräparate zu empfehlen, die Lokalisation kann mit den anderen Methoden ebenso sicher ermittelt werden. Die Präparate werden 24 Stunden mit gesättigtem Barytwasser mazeriert, wodurch in vielen Fällen eine in Wasser schwer lösliche, gelatinöse, farblose Saponinbarytverbindung entsteht. Das überschüssige Barytwasser wird mit Kalkwasser entfernt. Durch eine 10proz. wässerige Lösung von Kaliumdichromat wird die Saponinbarytverbindung zersetzt und das Baryum in den Saponinzellen in gelbes unlösliches Baryumchromat übergeführt. Gerbstoffhaltige Zellen werden hierbei nur braunrot (Niederschlag) und geben keinen Anlaß zur Verwechslung mit den Saponinzellen. Werden aber die mit Barytwasser mazerierten Schnitte statt mit Kalkwasser mit reinem Wasser ausgewaschen, dann geht die Barytverbindung der Saponine in Lösung. Combes untersuchte Gypsophila, Saponaria, Arum, Aesculus, Anagallis, Digitalis.

Die Saponine sind nach Combes[1]) in allen Fällen in den Parenchymzellen lokalisiert, vornehmlich in der Rinde, doch auch im Mark und in den Markstrahlen.

Man kann auch mit Conrard[2]) das Baryumchromat mit Silbernitrat umsetzen und erhält so dunkelrote Tafeln von Silberchromat.

Im Samen von Nigella sativa findet sich Melanthin, das nach v. Schulz ein Saponin ist. Vanderlinden (Lit. S. 457,1) erhielt im

---

[1]) R. Combes, Sur une méthode générale de recherches microchimiques et son application a l'étude de la répartition des saponines chez les végétaux, Compt. rend., 1908, CXLV, S. 1431.

[2]) Conrard nach Chem. Zentralbl., 1927, II, S. 1969.

Bast der Wurzel eine rote Färbung mit konz. Schwefelsäure, die nur kurze Zeit beständig ist. Schwächer tritt die Reaktion im Endosperm ein. Die vegetativen Teile geben die Reaktion nicht.

Reich[1]) wandte zur Untersuchung der Lokalisation die Verfahren von Lafon und Combes an. Er fand Saponin:

Bei den Wurzeln von Saponaria officinalis und Gypsophila paniculata in Rindenparenchym, Mark und den primären Markstrahlen, und zwar an deren Enden in Rinde und Mark, bei den Sarsaparillwurzeln im Rindenparenchym, im Samen des Assamtees in allen Teilen des Kotyledonargewebes, besonders in den Randpartien, in den Samen von Bassia latifolia im Kotyledonargewebe zusammen mit gerbstoffhaltigen Farbstoffmassen, in der Senegawurzel im Rindenparenchym besonders der äußeren Partien und beim Kornrade-Samen im Embryo und den Kotyledonen.

Nur der Vollständigkeit halber sei eine lediglich versuchsweise zu Lokalisationsstudien verwendete Reaktion von Sagel[2]) erwähnt. Verreibt man etwas Saponin mit 2 Tropfen Essigsäureanhydrid und versetzt dann mit einem Tropfen konz. Schwefelsäure, so tritt sofort eine rote Färbung ein. Gegen die Anwendung dieser Reaktion sind dieselben Einwände zu erheben wie gegen alle Reaktionen, bei denen Schwefelsäure verwendet wird.

Ebenfalls nur beschränkte Anwendung hat die von Kobert gemachte Beobachtung gefunden, daß in Saponinlösungen enthaltenden Dialysierhüllen, die man in Farbstofflösungen eintaucht, der Farbstoff sich allmählich anreichert. Fischer legt Epidermisabzüge — nur diese eignen sich dazu — mindestens 3—4 Stunden in wässerige verdünnte Gentianaviolett- oder Methylenblau-Lösungen (1 : 60 000) und untersucht nach kurzem Abschwemmen.

Neuerdings wird auch die von Kobert entdeckte hämolysierende Wirkung der Saponine zum Studium der Lokalisation herangezogen. Dies ist zuerst von Luft[3]) versucht worden, der aber die durch die gleichzeitige Gegenwart von Gerbstoffen verursachte Störung nur unvollkommen überwinden konnte. Besser gelingt dies durch die von Kofler, König und Fischer eingeführte Methode, die sich der Blutgelatine bedient.

Die Herstellung der Blutgelatine nimmt Fischer[4]) in folgender Weise vor: Gute Gelatine wird zu 8 % in einer mol./$_{30}$-Phosphat-

[1]) M. Reich, Über den mikrochemischen Saponin-Nachweis in der Pflanzenzelle, Abhandlungen der naturforsch. Ges. Rostock, 1913, S. 321.

[2]) K. Sagel, Zum Saponinnachweis, Pharmaz. Zentralh., 1914, LV, S. 268.

[3]) G. Luft, Die Verteilung der Saponine und Gerbstoffe in der Pflanze, Monatshefte f. Chemie, 1926, XLVII, S. 259.

[4]) R. Fischer, Über den mikroskopischen Saponinnachweis durch Blutgelatine, Pharmaz. Monatshefte, 1928.

pufferlösung von pH = 7,4 aufgelöst, die einen Zusatz von 0,9 % Natriumchlorid enthält. Daneben soll man auch einen Puffer von etwa pH = 6 verwenden, da es Saponine gibt, die bei sauerer Reaktion wesentlich stärker hämolytisch wirken, als bei alkalischer. Bei Gegenwart von Pflanzensäuren muß ein stark alkalischer Puffer (pH etwa = 10) verwendet werden. Wenn die Gelatine sauer reagiert, wird sie vorher mit Natriumbikarbonat neutralisiert. Im Sommer kann eine höhere, im Winter eine niedrigere Gelatinekonzentration verwendet werden.

Die Lösung wird in Reagensgläser gefüllt und kurz sterilisiert. Zum Versuche werden 2—3 ccm verflüssigte Gelatine (von nicht über 40°) in einem Reagensglas mit 2—3 Tropfen defibriniertem Blut[1]) versetzt. Das Reagensglas wird unter fließendem Wasser so lange gekühlt, bis der Inhalt erstarrt ist. Inzwischen wird ein Objektträger mit dem Untersuchungsobjekt quer über eine bis zum Rand mit kaltem Wasser gefüllte kleine Schale gelegt, so daß die Unterseite des Objektträgers die Wasserfläche berührt und der Schnitt so gekühlt wird. Ein erbsengroßes Stück der Blutgelatine wird sodann mit Hilfe eines Deckglases auf den am Objektträger befindlichen gleichmäßig dicken Schnitt so gedrückt, daß er von der Gallerte völlig eingeschlossen ist. Bei einer Wurzel oder einem Stengel muß der Querschnitt durch einen Schnitt genau halbiert oder in Sektoren geteilt werden. Bei stärker wirkenden Saponinen beobachtet man nach wenigen Minuten, bei schwächer wirkenden nach 1—2 Stunden eine am Rand des Schnitts auftretende blutkörperchenfreie Zone = hämolytischer Hof.

Bei Untersuchung der Lokalisation besonders saponinreicher Pflanzen ist eine höhere Konzentration des Blutes und der Gelatine zweckmäßig. Bei fetthaltigen Schnitten empfiehlt sich vorherige Entfettung mit Äther. Immerhin muß bei der hämolytischen Methode im Auge behalten werden, daß es außer den Saponinen auch noch andere Stoffe (Agarizinsäure, Helvellasäure, Lichesterinsäure) u. a. gibt, die rote Blutkörperchen hämolysieren.

Der Saponinnachweis mit Blutgelatine wurde neuerdings von R. Fischer[2]) z. T. in Gemeinschaft mit J. Thiele vervollkommnet.

Will man eine vollkommen klare Gelatine, so löst man Gelatine zu 6—9 % in einer 0,7 % Kochsalz enthaltenden m/30 Phosphatpufferlösung unter Erwärmen auf, gibt dann bei 35° etwa 2 g frisches Hühnereiweiß (oder die entsprechende

[1]) Als Blut kann Ratten- oder Menschenblut verwendet werden, eventuell auch anderes Blut, wenn sich dessen Blutkörperchen gegenüber dem vorliegenden Saponin als besonders empfindlich erweisen.

[2]) R. Fischer, Über den Saponinnachweis in der Pflanze mit Blutgelatine. Monatshefte f. Chemie 1930, LVI, S. 282.

Lösung von trockenen Eiweiß) hinzu, kocht etwa eine halbe Stunde und filtriert heiß durch Watte.

Für jede Untersuchung werden Gelatine mit pH = 6,1; 7,4; 8,4 und 10,0 verwendet. Man legt gleichzeitig vier gleichdicke Schnitte in die vier Gelatinen und beobachtet die Zeit, die verstreicht, bis sich ein gerade sichtbarer Hof zeigt. Aus den Zeiten soll auf die Stärke der Hämolysewirkung in den einzelnen Puffern und auf den Saponingehalt geschlossen werden.

Um Verwechslungen mit anderen hämolytischen Stoffen auszuschließen, wird folgendermaßen verfahren:

Man kocht die Schnitte in einem Reagensglas mit aufgesetztem Kühler mit soviel gesättigter Cholesterinlösung, daß sie von der Flüssigkeit bedeckt sind. Bei Pflanzen mit mittlerem Saponingehalt löst man das Cholesterin in gleichen Teilen Äther und absolutem Alkohol und kocht ½ bis ¾ Stunden, bei sehr hohem Saponingehalt verwendet man 90proz. Weingeist und kocht 40—75 Minuten, bei sehr geringem Saponingehalt verwendet man Äther allein und kocht 30 Minuten.

Die so behandelten Schnitte werden mit einer Federfahne aus der Lösung entnommen, ganz kurz in Äther gewaschen und in Blutgelatine gelegt. Sind sie dann durch Bindung des Saponins an Cholesterin unwirksam geworden, so kocht man sie in einem Reagensglas mit aufgesetztem Steigrohr 1—2 Stunden mit so viel Xylol, daß sie gerade davon überdeckt sind. Dann wäscht man sie mit Äther und legt sie nach Vertreibung des Äthers wieder in Blutgelatine. Tritt jetzt Hämolyse — wenn auch nach längerer Zeit als vorher — ein, so gilt Saponin als nachgewiesen.

Folgende Ergebnisse wurden von Fischer mit seiner Methode erzielt:

Aesculus hippocastanum L. Blatt: Besonders starke Hämolyse an den angeschnittenen Gefäßbündeln, im Blattstiel hauptsächlich im Phloem. Junger Ast: Rinde. Unreife Frucht: Am stärksten das Nährgewebe des Samens, dann Perikarp und die noch weiße Samenschale. Reife Frucht: In der Samenschale kein Saponin mehr.

Polygala senega L. In der Rinde der Hauptteil des Saponins, ferner Epidermis, Hypodermis und der ganze Holzkörper.

Primula officinalis Jacq. Wurzelrinde und Mark stark, Holz schwächer (bei Pr. elatior Jacq. auch in den Samen).

Primula auricula L.: Die ganze Pflanze saponinhaltig einschließlich Blattepidermis und Blüte.

Saponaria officinalis L.: Blattepidermis wenig, Mesophyll mehr. Stengel: Rinde und Mark stärker als Holz. Blüte: Korolle am Grunde bei den Gefäßbündeln stark, ebenso der Griffel. Wurzel: Sekundäre Rinde stärker, Holz schwach, Mark wieder stärker.

Hedera helix L. Blatt: Epidermis und Mesophyll stark. Stengel und Wurzel: Sekundäre Rinde und Mark schwach, primäre Rinde schwächer, Holz sehr schwach.

Cyclamen europaeum L. Knollen gleichmäßig und stark. Blattepidermis stark, Mesophyll schwächer, Stengel gleichmäßig. In sämtlichen Teilen der Blüte.

Cyclamen persicum. Starke Hämolyse im Mesophyll, keine in der Epidermis, sonst wie vorhergehend.

Convallaria majalis L. Blatt schwach, mehr an den angeschnittenen Gefäßbündeln. Blattscheide am Grunde stärker als gegen die Spitze. Stengel schwach, mehr in den Siebteilen der Gefäßbündel. Rhizom stark, besonders in der Rinde. Same, Kotyledo: Nichts. Samenhaut und Perikarp mittelstark. Sproß für das nächste Jahr sehr stark.

Herniaria glabra L. und hirsuta L. Stengel: Rinde gleichmäßig, Holz nichts. Blatt: Sehr stark. Same: Nährgewebe stark.

Androsace chamaejasme Host. Blatt mittelstark, besonders an den Gefäßbündeln. Stengel und Wurzel stark in Rinde.

Clematis viticella L. Blatt sehr schwach, etwas mehr an der Ausmündung der Gefäßbündel. Ganze Blüte wirksam, ebenso Stengel.

Clematis vitalba L. Ganze Pflanze außer der Blattepidermis saponinhaltig.

Paris quadrifolius L. Blattepidermis nichts, Mesophyll schwach. Stengel und Wurzel: Rinde stark, Holz nichts, Mark schwach. Frucht und Same mittelstark.

Chenopodium bonus Henricus L. Epidermis und Mesophyll schwach, ganze Blüte und Same im Nährgewebe mittelstark. Stiel sehr schwach, in der Wurzel nur die Rinde deutlich.

Deutzia gracilis. Blatt sehr schwach, nur an der Ausmündung der Gefäßbündel stärker. Stengel im Bereich der Rinde schwach, ebenso unreifes Mesokarp. Same nichts.

Philadelphus coronarius L. Blatt schwach, Stengel nur in der Rinde mittelstark.

Polygala amara L. Blatt und Stengel stark, unreife Frucht stärker als der Same.

Schwache, gerade noch sichtbare Hämolyse trat ein bei der Wurzel von Viola odorata L., im Blatt von Betula alba L., in den Gefäßbündeln und im Nährgewebe von Myristica fragrans Houtt.

Von den folgenden Pflanzen wurden nur die Samen untersucht:

Agrostemma githago L. Embryo sehr stark, Endosperm schwach, Samenschale nichts.

Citrullus vulgaris Schrad. Embryo und Samenschale schwach.

Dianthus caryophyllus L. Unreife Samenhaut, Nährgewebe und Plazenta mittelstark, Fruchtwand sehr schwach.

Digitalis purpurea L. Überall sehr starke Hämolyse.

Senf- und Lauchölglykoside

Die Senföle treten in der Pflanze als Glykoside auf, aus denen sie durch Enzyme (Myrosin, s. d.) abgespalten werden. Enzyme und Glykoside sind in den Zellen getrennt lokalisiert. Bei Verwundungen treten die Enzyme zu den Glykosiden und spalten bei Gegenwart von Wasser die stark riechenden, Schwefel und Stickstoff führenden Senföle ab. Die Senfölglykoside sind aus diesem Grunde als Schutzmittel gegen tierische Feinde angesprochen worden. Doch betont Verschaffelt, daß Pieris-Raupen mit Vorliebe Pflanzen fressen, die Senföle enthalten[1]). Durch Anästhetika und Frost kann die Spaltung an lebenden Pflanzen hervorgerufen werden (L. Guignard, Compt. rend., 1909, CXLIX, S. 91).

An Senfölglykosiden sind bekannt: Sinigrin (s. unten), Sinalbin (s. S. 656).

Glucotropaeolin aus den Samen von Tropaeolum majus L. und Lepidium sativum L. Spaltung durch Myrosin in Benzylsenföl, Kaliumbisulfat und Zucker.

Gluconasturtiin aus den Samen von Nasturtium officinale R. Br. und Barbaraea praecox R. Br.

Spaltung durch Myrosin unter Bildung von Phenyläthylsenföl, letzteres auch aus Brassica rapa var. rapifera Metzger und der Wurzel von Reseda odorata L.

Glucocheirolin aus den Samen von Cheiranthus cheiri L., Myrosin zersetzt in Cheirolin, Glykose und Kaliumbisulfat.

Bekannt sind noch sek. Butylsenföl aus Cochlearia officinalis L. d-Butylsenföl aus Cardamine amara L., Crotonylsenföl aus den Samen von Brassica napus L. und Erysolin aus den Samen von Erysimum perowskianum.

Vgl. dazu J. H. Schweidler, Beiträge zur systematischen Bedeutung der Cruciferen-Idioblasten, Jahresber. k. k. Staatsgymnasiums, Cilli, 1916; Ref. in Bot. Centralbl., 1919, CXLI, S. 161.

Sinigrin

Sinigrin (Myronsäure, Bussy, 1840, Gadamer u. a.) kristallisiert aus Weingeist in kleinen Nadeln, aus Wasser in kurzen Säulen (F. 128°). Die Kristalle lösen sich leicht in Wasser, schwer in verd. Weingeist, wenig in absolutem Alkohol, nicht in Äther und Chloroform. Bei der Spaltung bilden sich Glykose, saures Kaliumsulfat und Allylsenföl; da letzteres von Wasser und wohl auch von Bakterien angegriffen wird, so entstehen in geringer Menge sekundäre Nebenprodukte (Schwefelkohlenstoff, Schwefel u. a.).

Sinigrin ist dargestellt aus den Samen von Brassica nigra Koch, der Wurzel von Cochlearia armoracia L. und den Samen von Alliaria officinalis D. C. Es kommt aber wahrscheinlich noch in vielen Pflanzen aus der Familie der Cruciferen und benachbarter Familien vor. Mit Hilfe mikrochemischer Reaktionen (s. u.)

[1]) E. Verschaffelt, Die Ursache der Nahrungswahl bei einigen pflanzenfressenden Insekten, Versl. Kon. Ak. Wet. Amsterdam, 29. X. 1910.

hat Pietschmann[1]) die Entstehung von flüchtigem Senföl nachgewiesen bei Lepidium sativum L. (Blatt, Stengel), Lepidium draba L. (Blatt, Stengel), Thlaspi arvense L. (Samen), Alliaria off. Andr. (Wurzel, Blatt, Stengel, Samen), Sisymbrium sinapistrum Cr. (Wurzel), Sinapis arvensis L. (Blatt), Brassica nigra Koch (Samen), Cardaminum nasturtium Much. (Wurzel, Blatt, Stengel), Armoracia lapathifolia Gilib. (Wurzel, Blatt, Stengel), Cardamine amara L. (Wurzel, Blatt, Stengel), Cardamine pratensis L. (Wurzel, Blatt, Stengel), Reseda luteola L.) Wurzel, Blatt, Stengel, Samen), Reseda lutea L. (Wurzel, Blatt, Stengel, Samen), Tropaeolum majus L. (Wurzel, Blatt, Stengel) und der Phytolaccacee Petiveria alliacea L. (Wurzel, Blatt, Stengel).

Die Destillate dieser Pflanzenteile prüfte Pietschmann mit Hilfe folgender Reaktionen auf Allylsenföl.

a) Mit Phenylhydrazin (Base). Ein Tropfen einer 0,00002proz. Lösung von Allylsenföl gibt auf dem Objektträger — am besten nach Zusatz von ein wenig Weingeist — feine dünne Nadeln. Bei größerer Konzentration entstehen außer längeren, manchmal verzweigten Nadeln längere sechsseitige zugespitzte, unter dem Mikroskop weiß erscheinende Plättchen, unlöslich in Weingeist, löslich u. a. in Wasser, Glyzerin, Chloralhydrat.

b) Der größere Teil des Destillats wird mit der halben Menge konz. Ammoniakflüssigkeit versetzt und ca. 12 Stunden in gut verschlossenem Gefäße aufbewahrt. Dann wird im Becherglas bis auf einen kleinen Rest eingeengt. Von dieser Flüssigkeit bringt man 1—2 Tropfen auf einen Objektträger und läßt bei normaler oder ein wenig erhöhter Temperatur verdunsten. Nach Bedarf wiederholt man das Auftragen der Flüssigkeitstropfen. Je nach der Konzentration der Lösung entstehen Kristalle von Allylthioharnstoff (Thiosinamin), deren Art stark von der Konzentration und von Verunreinigungen abhängt. Gibt man dazu einen Tropfen Silbernitrat (0,3 g Silbernitrat, 25 Tropfen verdünnte Salpetersäure in 100 ccm), so erhält man — bei sehr starker Verdünnung erst nach dem Trocknen — feine, lange, meist verzweigte bündel- oder büschelförmig angeordnete Nadeln.

Mit Hilfe dieser Reaktionen stellte Pietschmann fest, daß der Gehalt an Senfölglykosid bei Wurzel und Stengel von Armoracia lapathifolia, sowie der Wurzel von Alliaria officinalis in der Rinde größer ist als im Holz. Bei Alliaria officinalis wird die Ausbeute an Senföl mit zunehmendem Alter der Pflanze in Wurzel und Blättern geringer, während sie im Samen mit fortschreitender Reifung zunimmt. Er nimmt deshalb eine Wanderung in dieser Richtung an und betrachtet sie nicht als Exkrete.

[1]) A. Pietschmann, Zum mikrochemischen Nachweis der Senföle, Mikrochemie, 1924, II, S. 33.

Es geht aus der Arbeit von Pietschmann nicht hervor, inwieweit mit diesen Verfahren eine Unterscheidung von Allylsenföl und anderen flüchtigen Senfölen möglich ist.

Zum mikrochemischen Nachweis flüchtiger Senföle kann man auch folgendes Verfahren benützen[1]): Man befeuchtet ein wenig das Material (0,05 g Senfmehl) in der Molischschen Glaskammer mit ein wenig Wasser, bedeckt mit einem Deckglas, an dessen Unterseite ein Tropfen einer mit Salzsäure angesäuerten 1proz. Permanganatlösung hängt, und erwärmt nach 10 Minuten mit kleiner Flamme des Mikrobrenners. Nach 5 Minuten nimmt man das Deckglas ab, versetzt die Permanganatlösung mit einem Tropfen Salzsäure und bringt Permanganat und Braunstein durch leichtes Erwärmen über dem Mikrobrenner zum Verschwinden. Läßt man dann einen Tropfen Baryumchlorid hinzufließen, so tritt Trübung durch Baryumsulfat ein.

Das Verfahren eignet sich zum Nachweis aller flüchtigen Schwefelverbindungen, die durch Permanganat zu Schwefelsäure oxydiert werden. Es empfiehlt sich deshalb, diesen Nachweis durch den mit Phenylhydrazin zu ergänzen. Man verfährt wie oben, bringt aber an die Unterseite ein Tröpfchen Phenylhydrazin-Base. In 12—24 Stunden bilden sich dann Nadeln der Additionsverbindung, die durch Behandeln mit Weingeist, in dem sie unlöslich sind, stärker hervortreten.

Zum mikrochemischen Nachweis des Sinigrins brachte Guignard[2]) die Präparate in eine Weinsäurelösung. Da Sinigrin kaliumhaltig ist, so müssen sich in den Sinigrinzellen Kristalle von Kaliumtartrat bilden. Diese entstehen auch in schöner Weise, liegen aber um das Präparat herum in der Flüssigkeit, weniger über dem Präparate und selten in den Sinigrinzellen (S. 171, Fig. 37). Die Reaktion wird ferner dadurch wenig brauchbar, daß außer dem Kalium des Sinigrins auch das Kalium anderer Verbindungen in Reaktion tritt. Eine Trennung des *glykosidischen Kaliums von den übrigen Kaliumverbindungen* (Kaliumsulfat, Kaliumchlorid) ist schwer durchzuführen, da das Glykosid sehr leicht wasserlöslich ist. Besser läßt sich das Kalium mit Platinchlorid nachweisen. Bei Präparaten des Meerrettich (das beste Versuchsobjekt) entstehen die bekannten Kristalle von Kaliumplatinchlorid zwar auch im Beobachtungstropfen und auf dem Präparate, doch auch in den Zellen sind sie zu finden.

Theoretisch richtiger ist das Verfahren, das myronsaure Kalium in Allylsenföl überzuführen und letzteres mit Alkanna nachzuweisen.

---

[1]) L. Rosenthaler, Chemische Charakterisierung von Drogen, Pharmac. Acta Helvetiae, 1926, I, S. 72.

[2]) L. Guignard, Sur la localisation des principes qui fournissent les essences sulfurées des Crucifères, Compt. rend., 1890, CXI, S. 249.

Immerhin erfordert auch diese Methode Guignards, an Samen wenigstens, einige Übung. Zunächst werden die fetten Öle nach Guignard mit Weingeist, besser mit Äther entfernt. Das Sinigrin bleibt in den Zellen ungelöst zurück, doch wird gleichzeitig das Myrosin fixiert und abgetötet. Zur Spaltung des Glykosides muß somit eine Myrosinlösung zugesetzt werden. Man benutzt hierzu eine aus weißem Senfsamen oder aus den Flügeln der Samen von Lunaria biennis frisch bereitete Lösung (s. Myrosin). Nun ist zu beachten, daß die Präparate wenigstens 10—20 Minuten in der Myrosinlösung verbleiben, und zwar bei einer Temperatur von mindestens 50^0 (schwaches Erwärmen). Die Präparate werden dann herausgenommen, mit Wasser abgespült und auf dem Objektträger in einen Tropfen Alkannatinktur gelegt; nach 2—3 Minuten wird die Alkannatinktur abgesaugt und durch Glyzerin ersetzt. In den Sinigrinzellen, d. s. die meisten Parenchymzellen, erscheinen jetzt kleine tiefrot gefärbte Tröpfchen von Allylsenföl, die mit Äther entfettete, aber nicht mit Myrosin behandelte Präparate nicht zeigen. Man stelle die Reaktion erst an Präparaten des Meerrettich an, bei Cruciferensamen ist sie weniger deutlich.

Peche[1]) versuchte das Sinigrin durch Reduktionsreagentien (alkoholisch-ammoniakalische Silbernitratlösung, Osmiumsäure und Soda-Kaliumpermanganat) nachzuweisen. Schnitte durch Rettich wurden a) mit alkoholisch-ammoniakalischer Silbernitratlösung erhitzt: Schwarzfärbung durch metallisches Silber, b) mit Wasser abgewaschene Schnitte[2]) werden in kalte 1proz. Osmiumsäure eingelegt oder darin bis zum Aufwallen erhitzt: Graubraun, c) die Schnitte werden — nicht länger als ½ Minute — in Soda-Kaliumpermanganatlösung getaucht: hellgelbe Färbung. Daraus, daß es in allen drei Fällen dieselben Zellen sind, die reagieren, schließt Peche, daß es sich um die Myrosinzellen handelt. Er findet sie in der Rettichrinde hauptsächlich in der Nähe der Gefäßbündel, sehr zahlreich in den Gefäßbündelscheiden, zerstreut im Rindenparenchym, immer umgeben von Glykosidzellen.

Zum mikrochemischen Nachweis des Allylsenföls eignen sich nach Rosenthaler[3]) folgende Reaktionen: 1. Mit 50proz. Piperazinlösung entstehen farblose Stäbe und Prismen; 2. mit Bromwasser oder Brombromkalium amorpher, gelber Niederschlag; 3. mit ammoniakalischer Silberlösung Bildung von schwarzem Silbersulfid.

[1]) K. Peche, Mikrochemischer Nachweis des Myrosins, Ber. deutsch. bot. Ges., 1913, XXXI, S. 458.

[2]) Bei der Wasserlöslichkeit des Sinigrins bedenklich.

[3]) L. Rosenthaler, Mikrochemische Charakterisierung ätherischer Öle, Pharmac. Acta Helvetiae, 1926, I, 117.

Sinalbin

Das Senfölglykosid der Samen von Sinapis alba, das Sinalbin (F. 84°), ist von Will und Laubenheimer in kristallinischer Form isoliert worden. Es löst sich leicht in heißem Wasser und in heißem 85 proz. Weingeist. In kaltem 85 proz. und in absolutem Alkohol, sowie in Äther und in Schwefelkohlenstoff ist es unlöslich. Durch Myrosin zerfällt es in Glykose, saures schwefelsaures Sinapin und p-Oxybenzylsenföl.

Sinalbin läßt sich nach der Guignardschen Methode (S. 654) nachweisen, indem man die mit Äther entfetteten Präparate des Keimlings mit Myrosin behandelt und das frei gewordene Senföl mit Alkannatinktur färbt. Des weiteren kann man nach Hartwich und Vuillemin[1]) Millons Reagens benutzen, das bei Erwärmen mit Sinalbin eine Rotfärbung gibt. Hierbei färben sich allerdings die Myrosinzellen ebenfalls mit. Diese Reaktion ist auch von praktischer Bedeutung, da es mit ihr gelingt, die zuweilen übliche Beimischung von Sinapis alba und arvensis im Pulver von Brassica nigra leicht und schnell zu ermitteln (Sinigrin reagiert nicht mit Millon).

Als Hilfsreaktionen[2]) erscheinen die nachstehenden nicht ungeeignet. Konzentrierte Salpetersäure ruft sofort eine gelbrote Färbung hervor. Die Farbe verblaßt innerhalb einer Minute. Die Samenschale bleibt dabei unverändert. Mit Kalilauge, mit der reines Sinalbin rot wird, entsteht im Keimling eine tieforange Färbung, die Samenschale bleibt unverändert. Bei gelindem Erwärmen geht die orange Färbung der Sinalbinzellen in ein leuchtendes Braunrot über, während die Samenschalen jetzt schwach gelblich werden. Bei beiden Reaktionen treten die Fetttropfen ungefärbt aus den Präparaten hervor.

Der mikrochemische Nachweis des Sinalbins[3]) läßt sich in folgender Weise erbringen: 0,25 g weißes Senfmehl werden in einem Reagensgläschen mit Wasser befeuchtet. Nach mindestens 15, besser 30 Minuten wird mit einigen Kubikzentimetern Petroläther ausgeschüttelt und dieser nach Filtration durch ein doppeltes Filter freiwillig verdunsten gelassen. Der Rückstand gibt mit Millons Reagens eine intensive Rotfärbung.

Lauchölglykoside

Den Senfölen stehen in chemischer und physiologischer Hinsicht die Lauchöle nahe. Möglicherweise entstehen sie aus frei gewordenen Senfölen, worauf die

[1]) C. Hartwich u. A. Vuillemin, Beiträge zur Kenntnis der Senfsamen, Apoth.-Ztg., 1905, XX, S. 189.

[2]) Die Reaktionen von R. F. Solla (Über zwei wahrscheinlich mikrochemische Reaktionen auf Schwefelcyanallyl, Bot. Centralbl., 1884, XX, S. 342) basieren auf falschen Voraussetzungen und wurden bereits von E. Bachmann (Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1885, II, S. 261) als unbrauchbar bezeichnet.

[3]) L. Rosenthaler l. c., s. S. 654, Anmerkung 1.

Tatsache hindeutet, daß junge Pflänzchen von Alliaria officinalis nur Senföle, ältere daneben auch Knoblauchöl enthalten (Wertheim, 1844).

Mikrochemisch hat Voigt[1]) das Knoblauchöl im Gewebe verfolgt, indem er größere Pflanzenstücke in wässerige Lösungen von Palladiumoxydulnitrat (in wasserheller Verdünnung) oder von Silbernitrat (1 bis 2 %) einlegte. Durch Evakuieren wurde das Eindringen der Lösungen beschleunigt. Nach dem Abspülen kamen die Pflanzenstücke zur Härtung in absoluten Alkohol. Nun wurden die Präparate hergestellt. Außerdem wurden dünne Epidermisstücke und unter Wasser hergestellte Präparate direkt auf dem Objektträger in die betreffenden Reagentien eingelegt. Untersucht wurden Allium cepa, sativum, porrum (Fig. 151), schoenoprasum, moly, victorialis, ursinum, fistulosum, urceolatum, coerulescens. Das Öl fand sich in der Epidermis (Stengel, Blätter, Zwiebelschuppen), Gefäßbündelscheide (Blüten), in den Durchlaßstellen der äußeren Endodermis (Wurzeln), ferner im Endosperm in der den Embryo umgebenden Zellschicht, sowie in Samen- und Fruchtschalen.

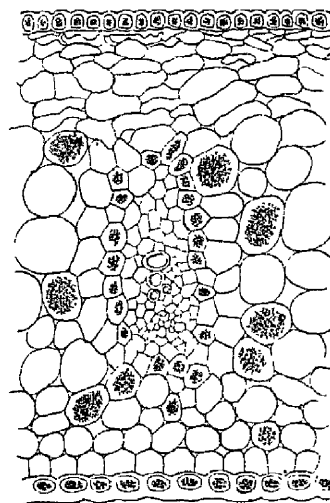



Fig. 151. Allium porrum (Blattbasis, Querschnitt). Die schraffierten Zellen führen die Glykoside (Tunmann)

W. Peyer (Südd. Apotheker Ztg., 1927, Nr. 72) wandte zum Nachweis des Knoblauchöles außer Sudan III eine 1 proz. weingeistige Lösung von Nilblau an und behandelte das Präparat nach dem Eintrocknen mit Wasser. Die Ölkugeln nehmen dann eine rote Färbung an und sind — außer in den Gefäßen — fast in allen Zellen zu beobachten.

Strophanthine

Die Samen von Strophanthus hispidus P. D. C. und Strophanthus Kombe Oliv. enthalten Glykosidgemische, die man, so lange man sie nicht als solche erkannt hatte, als p- und k-Strophanthin bezeichnete, während man jetzt mit diesen Namen je einen kristallinischen Bestandteil dieser Gemische bezeichnet hat. Als einheitlich wird das gut kristallisierende g-Strophanthin aus Strophanthus gratus (Wall. et Hook.) Franch. betrachtet; es soll mit dem in Acokanthera-Arten vorkommenden Ouabain identisch sein (Arnaud).

Alle Strophanthine geben hydrolysiert ein in Wasser unlösliches Aglykon (Strophantidin) und einen eigenartigen Zucker.

Zum mikrochemischen Nachweis wurden die Reaktionen von Helbing (Pharm. Journ. and Transact. 1887, S. 924) benutzt, Ferri-

[1]) A. Voigt, Lokalisierung des ätherischen Öles in den Geweben der Allium-Arten, Jahrb. Hamburger Anst., 1889, XXXVI, S. 391.

chlorid-Schwefelsäure sowie Schwefelsäure. Man läßt den Schnitt in etwas Ferrichlorid vollsaugen und überträgt ihn in Schwefelsäure; es entsteht ein rotbrauner, meist schwer wahrnehmbarer Niederschlag, der nach längerer Zeit (1—3 Stunden) grün wird. Besser wirkt Schwefelsäure allein, die man jetzt ausschließlich anwendet; es tritt für kurze Zeit eine blaue Färbung ein, die bald in Grün übergeht. Die Reaktion wird durch die Stärke der Schwefelsäure beeinflußt (Gordon Sharp). Über die Lokalisation des Strophanthins sind wir nur beim Samen unterrichtet. „Das Strophanthin ist im Zellinhalt des Endosperms und des Embryos enthalten" (Hartwich)[1]. Die Reaktion tritt stets im gesamten Endosperm und den äußeren Teilen der Keimblätter ein. Diese Forderung stellte auch das 5. deutsche Arzneibuch bei der offizinellen Strophanthus-Droge. Zuweilen färbt sich der ganze Embryo intensiv (die Leitbündelanlagen rot). Strophanthus zeigt große individuelle Schwankungen im Strophanthingehalt. Interessant ist die Beobachtung Hartwichs[2] über Samen, bei denen das eine Keimblatt eine starke Reaktion gibt, während das andere keine Spur von Strophanthin enthält. Nach Hartwichs Ansicht rühren diese Samen von Pflanzen her, die aus der Bastardierung von strophanthinhaltigen und strophanthinfreien Eltern hervorgegangen sind (vegetative Bastardspaltung).

Sehr eingehend ist die Schwefelsäurereaktion der Strophanthussamen von Gilg und Schuster[3]) studiert worden. Am besten eignen sich nach ihnen dünne trockene Schnitte durch den ganzen Samen, da sich dann die Kotyledonen leicht herausnehmen und — was zweckmäßig — getrennt von dem Endosperm untersuchen lassen. Die Schnitte bedeckt man auf einem Objektträger mit 80proz. Schwefelsäure und beobachtet sofort unter dem Mikroskop. Gilg und Schuster unterscheiden 1. Anfangsreaktion — bei allen Arten gleich (gelb bis orange); 2. spezifische Reaktion — Farben nach Art bzw. Artgruppen verschieden; 3. Aufhellungsreaktion — Farben verschieden, vorwiegend violett, blaß. Die spezifische Reaktion tritt in der Regel in 1—10 Minuten ein; die Aufhellung geht oft ziemlich langsam vor sich.

Morphologisch deutlich geschiedene, aber systematisch nächststehende Arten können die gleiche Reaktion geben; niemals gibt aber die gleiche Art verschiedene Reaktion.

[1]) C. Hartwich, Über den Strophanthussamen, Arch. d. Pharm., 1888, CCXXVI, S. 500.

[2]) C. Hartwich, Weitere Bemerkungen über Semen Strophanthi, Apoth.-Ztg., 1907, XXII, Nr. 94.

[3]) E. Gilg u. J. Schuster, Die Schwefelsäurereaktion der Strophanthussamen, Ber. deutsch. pharmaz. Ges., 1919, XXIX. S. 220.

Folgende Übersicht über die in Schnitten von Strophanthus-Samen mit 80proz. Schwefelsäure nacheinander auftretenden Färbungen ist einer Arbeit von Mathiesen[1]) entnommen.

Strophanthus-Art	Farbreaktion der Schnitte in 80proz. Schwefelsäure.
Gratus (Wall. et Hook.) Franch.	Schwach hellrosa; hellrosa; nach rosa bis rosaviolett.
Courmontii Sad.	Hellgelb, hellorange, orange; rotorange; rotorange nach violett. Die Aufhellungsreaktion kann im Endosp. und in den Cot. ungleichmäßig verlaufen.
sarmentosus P. DC.	Gelb, hellorange; schwach rosarot; rötlich nach hellviolett. Besonders bei den bräunlich grauen Formen die Reaktion in den Cot. und im Endosp. ungleichmäßig verlaufend.
hispidus P. DC.	Hellgelb, gelbgrün, smaragdgrün; russisch grün; blaugrünviolett. Besonders die Cot. neben den grüngefärbten auch oft rosa bis rote Partien zeigend.
Kombe Oliv	Gelb, gelbgrün, smaragdgrün; russisch grün; im Embryo violetter Ton; dunkelblaugrün, violett.
Nicholsonii Holmes.	Hellgelb, gelb, hellrosa; leuchtend eosinrot; violett.
Eminii Aschers. et Pax.	Hellgelb, orange; rot; violett.

Syringin

Syringin (Bernays, 1841) bildet farblose lange Nadeln (F. 192°), die in kaltem Wasser sehr schwer, in heißem Wasser und in Weingeist leicht, in Äther nicht löslich sind; konz. Schwefelsäure färbt blau, dann violett, Salpetersäure rot. Bei der Hydrolyse entsteht amorphes rotes Syringenin und Glykose. Syringin tritt auf in: Syringa vulgaris L., Ligustrum vulgare L. und lucidum, Robinia pseudacacia, Jasminum nudiflorum Lindl. und fruticans L. Schell[2]) hielt es bereits für einen

[1]) F. J. Mathiesen, Über den Strophanthussamen des Handels, Pharmaceutic. Acta Helvetiae, 1927, II, S. 228; 1928, III, S. 34.

[2]) J. Schell, Über das Syringin, Arb. Naturf. Vers. Kasan, II, 1873 (russisch), Ref. Just Jahrb., 1873, S. 596.

Baustoff, der zur Bildung von Kohlehydraten dient. Nach Vintilesco[1]) tritt es am reichlichsten während der Vegetation auf und nimmt beim Blattfall ab; in alten abfallenden Blättern fehlt es.

Eine richtige Angabe über die Lokalisation des Syringins findet sich schon bei Schell. Benutzt wird konz. Schwefelsäure (Blaufärbung); setzt man den in Säure liegenden Schnitten Alkohol zu, dann schlägt die blaue Färbung in Rot um. Die späteren Beobachtungen von Borscow[2]) sind unrichtig, gingen aber als feststehend in die Literatur über. Nach Borscow, der Schwefelsäure mit 2 Teilen Wasser verdünnt benutzt, sollen alle verdickten Membranen des Holzes und der Rinde glykosidhaltig sein. Vorteilhaft legt man Schnitte lebenden Materials direkt in konz. Säure oder in schwach verd. Säure (1 + 1 Teil Wasser) und beobachtet sofort. Der Inhalt der Parenchymzellen wird zunächst gelbgrün, nach einigen Minuten indigoblau gefärbt. Der Farbstoff wird nun schnell von den verholzten Membranen, besonders von den Bastfasern gespeichert und führt so zu der (irrigen) Ansicht, Syringin sei in der Membran lokalisiert, was aber nicht der Fall ist, da die Wände sämtlicher Zellen meist ungefärbt bleiben. Nur bei Zusatz einer größeren Säuremenge und bei reichlichem Glykosidgehalt geht die blaue Färbung in Violett über. Auch Salpetersäure läßt sich benutzen, doch entsteht nur selten eine rote Färbung, gewöhnlich infolge geringen Glykosidgehaltes eine mehr gelbbraune bis braunrote Färbung, ebenfalls zuerst im Zellinhalte. Andere makrochemische Methoden (Kaliumpermanganat, Chromsäure) lassen sich zum mikrochemischen Nachweis nicht verwenden.

Thevetin

Von de Vrij aus den Samenkernen von Thevetia neriifolia Juss. (Apocynaceae) isoliert. Bitter schmeckende Blättchen (F. 170°) schwer löslich in kaltem, leichter in heißem Wasser, Weingeist und Eisessig; unlöslich in Äther. Mit konz. Schwefelsäure anfangs rotbraun, allmählich kirschrot und violett. Hydrolyse mit verdünnten Mineralsäuren ergibt Glykose und Theveresin (F. 140°).

Mit Schnitten durch Keimlinge und mittlere Fruchtwand erhielt Pool folgende Reaktionen: Mit konz. Schwefelsäure violettrot, mit konz. Salpetersäure gelb, mit konz. Salzsäure grün, mit Fröhdes Reagens violettbraun, mit Dichromat-Schwefelsäure violett.

Urginea-Glykoside

In den Zwiebeln von Urginea maritima (Linné) Baker kommen mehrere Glykoside vor, von denen neuerdings Scillaren A und B näher untersucht wurden,

[1]) J. Vintilesco, Rech. biochim. sur quel sucres et glucosides, Thèse Doct. Scienc. nat., Paris 1911.

[2]) El. Borscow, Beiträge z. Histochem. d. Pflanz., Bot. Ztg., 1874, XXXII, S. 17.

während es zweifelhaft ist, welche der in der älteren Literatur genannten (Scillipikrin, Scillitin, Xanthoscillid u. a.) chemische Individuen sind.

Scillaren A kristallisiert aus Methanol mit 6½ % CH_3OH in glänzenden vier- und sechseckigen Tafeln. Schwer in Wasser, am leichtesten in wasserhaltigem Weingeist löslich. Leicht zersetzlich. Hydrolyse ergibt Scillaridin A und ein Disaccharid, das bei weiterer Hydrolyse in Rhamnose und Glykose zerfällt.

Scillaren B ist in Wasser und Weingeist leicht löslich, ist aber nicht einheitlich. Liefert durch Hydrolyse, gegen die es weniger empfindlich ist als Scillaren A, das Scillaridin B.

In mikrochemischer Beziehung ist durch Kohli folgendes festgestellt worden:

Tannin ruft in den Zellen körnige, in einzelnen Zellen stark angehäufte Fällungen hervor. Fällungen entstehen auch mit Brombromwasserstoff und Silikowolframsäure; alle Fällungen entstehen auch, nachdem die Schnitte mit 70proz. Weingeist ausgekocht waren[1]). Rote Blutkörperchen (Blutgelatine) werden nicht hämolysiert.

Ferner wurde in den Zwiebeln von Urginea Burkeana ein Glykosidgemisch gefunden, das sich pharmakologisch ebenso verhält wie das Scillaren.

Gegenüber Reagentien verhalten sich die Schnitte durch Urginea Burkeana ungefähr so wie für U. maritima angegeben. Hämolyse tritt ebensowenig ein.

Verbindungen von Uronsäuren

Scutellarin

Scutellarin wurde von Molisch entdeckt, von Goldschmiedt[2]) aus Scutellaria altissima (Blätter und Blüten, Ausbeute 0,62—0,97 %) isoliert und näher studiert. Scutellarin kommt nur in der Familie der Labiaten vor, und zwar in den Gattungen Scutellaria, Teucrium, Galeopsis und Thymus. Es findet sich in Laubblatt und Kelch, weniger reichlich in den anderen Teilen der Blüte. in Stengel und Wurzel, nicht im Samen.

Strecker[3]) unterscheidet drei Arten des Scutellarin-Vorkommens: das sog. primäre oder autochthone, das zum erstenmal in belichteten Keimlingen auftritt, zweitens das transitorische, das von den Stellen der Erzeugung und von den Reservebehältern n ch den Stellen des augenblicklichen Bedarfes wandert, drittens das Reservescutellarin in den Reservestoffbehältern.

[1]) Es ist also nicht nachgewiesen, das diese Fällungen durch die Glykoside bedingt werden.

[2]) H. Molisch und G. Goldschmiedt, Über das Scutellarin, einen neuen Körper bei Scutellaria und anderen Labiaten, Sitzgsber. Wien. Akad., 1901, CX, 1. Abt., S. 185.

[3]) E. Strecker, Das Vorkommen des Scutellarins bei den Labiaten usw. und seine Beziehungen zum Lichte, Sitzgsber. d. Akad. d. Wiss. in Wien, 1909, CXVIII, Abt. I, S. 1379.

Scutellarin bildet strohgelbe, in Wasser und Weingeist lösliche Nadeln (F. 190°). Es gibt mit Barytwasser eine rostrote Färbung, mit einem Stich ins Feuerrote, dann mit Bromwasser dunkelgrün.

Hydrolyse führt zu Scutellarein und Glykuronsäure.

Zum mikrochemischen Nachweis setzt man frische Blätter auf 1 Stunde in verschlossenem Behälter den Dämpfen von konz. Salzsäure aus und legt dann größere Stückchen behufs Aufhellung in Chloralhydrat (einige Stunden) ein. In der Epidermis sind nun Sphärite (konzentrisch geschichtet mit radialer Streifung, bis 100 μ groß) von Scutellarin. Für Dauerpräparate werden die Objekte rasch mit Wasser abgespült, ½ Stunde in Glyzerin-Wasser (gleiche Teile) eingelegt und in Glyzerin eingebettet. Man kann ferner Schnitte in 10proz. Salzsäure legen; es entstehen teils Sphärite, teils büschel- und sternartig gruppierte Nadeln. Die Kristalle lösen sich in Ammoniak, Soda, Kalilauge, werden auf Zusatz einer Spur Ammoniak, Kalilauge, Natronlauge, Soda, Kalkwasser, Äthylamin und Trimethylamin tiefgelb. Der Schnitt mit dem auskristallisierten Scutellarin wird mit Wasser abgespült und abgetrocknet. Das Scutellarin wird beim Betupfen mit Barytwasser rosenrot (an der Luft nach einiger Zeit dunkelgrün) und bei nachfolgendem Einlegen in Jodchloralhydrat malachitgrün (Fig. 152).

Fig. 152. Scutellaria altissima, Scutellarinsphärite (mit Salzsäure), *a*) subepidermale Zellen des Stengels, *b*) obere Blattepidermis (Tunmann)

Scutellaria altissima L. Das Scutellarin ist hauptsächlich im Blatt, und zwar in der oberen Epidermis, sehr wenig in Stengel und Blütenstiel (obere Epidermis und Rindenparenchym), wenig in der Wurzel. In der Blüte sind Kelch, Korolle und Gynöceum reich an Scutellarin.

Glycyrrhizin

In der Süßholzwurzel, der Wurzel von Periandra mediterranea, der Rinde von Chrysophyllum glycyphloeum u. a.

Farblose Schuppen oder Prismen (F. 205°). Löslich in heißem Wasser, heißem verdünnten Weingeist und heißem Eisessig, auch in Alkalien.

Hydrolyse liefert Glycyrrhetin und Glykuronsäure.

Die Lösung in 25proz. Weingeist gibt Fällungen mit den Hydroxyden der Erdalkalien und Schwermetallsalzen.

Die Mikrochemie des Glycyrrhizins ist noch nicht bearbeitet. Es ist wohl aber sicher, daß es in der Süßholzwurzel in den Parenchymzellen lokalisiert ist. Auf Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure zu Schnitten

durch Süßholz, „färbt sich das ganze Gewebe strohgelb und der Farbstoff wird von den Membranen der Gefäße und der primären Membran der Bastfasern gespeichert" (Tschirch u. Oesterle, Anatom. Atlas).

Baicalin

Baicalin ist eine Glykuronsäureverbindung des 1, 2, 3-Trioxyflavons. Kommt im Zellsaft sämtlicher Rinden- und Holzparenchymzellen frischer Wurzeln von Scutellaria baicalensis vor[1]).

Eiweißkörper, Nukleoproteide, Plastin und Volutin

Die pflanzlichen Eiweißstoffe sind Körper hochzusammengesetzter Natur, die neben Stickstoff noch Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff, oft auch Schwefel und Phosphor führen, eine Anzahl Reaktionen gemeinsam haben, durch tierische Membranen nicht diffundieren (Kolloide) und beim Erhitzen koagulieren. Beim völligen hydrolytischen Abbau liefern die Eiweißstoffe Aminosäuren, die sowohl der Fettsäurereihe (Glykokoll, Alanin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin, Arginin, Cystin u. a.), als auch der aromatischen (Phenylalanin, Tyrosin) und der heterocyklischen Reihe (Tryptophan, Histidin u. a.) angehören.

Die Eiweißstoffe lassen sich in einige Gruppen vereinigen: die nativen oder genuinen Eiweißstoffe (Proteine); hierher gehören die phosphorfreien Albumine und Globuline, die phosphorhaltigen Nukleoalbumine, Vitelline u. a. Die genuinen Proteine bilden außerdem mit anderen organischen Komplexen hoch zusammengesetzte Verbindungen, die Proteide (Glykoproteide, Nukleoproteide). Hierzu kommen noch Abbauprodukte (Albumosen, Peptone), die noch Eiweißcharakter besitzen. Eiweißstoffe beteiligen sich an dem Aufbau des Protoplasmas in erster Linie am Aufbau des Zellkerns, der Chromoplasten, der Reservestoffe (Aleuronkörner)[2]). Doch soll nicht das Plasma jeder Zelle Eiweiß führen. Wie schon Sachs (Mikroch. Unters., 1862) angab und Reinke bestätigte, soll das Plasma ausgewachsener, gestreckter Parenchymzellen kein Eiweiß enthalten. Proteide kommen jedenfalls auch im Zellsaft vor.

Aus Eiweiß — ohne Gerbstoff — bestehen sowohl die typischen Stachelkugeln, die bei Nitella flexilis, opaca, capitata und syncarpa vorkommen, als die unbewimperten klumpigen Gebilde anderer Characeen und auch die im Zellsaft vorkommenden Blasen, aus denen wahrscheinlich die Stachelkugeln entstehen[1]).

Nicht selten findet man Eiweißkristalle, findet man sie in Weingeistmaterial, so muß geprüft werden, ob sie nicht erst durch den Weingeist entstanden sind (S. J. Mayr)[3]).

[1]) S. Shibata, S. Iwata und M. Nakamura, Über eine neue Flavon-Glykuronsäureverbindung aus der Wurzel von Scutellaria baicalensis (Biochem. Studien über die Flavonderivate (I), Bot. Mag. Tokyo, 1922, XXXVI, S. 1.

[2]) A. Votova, Beiträge zur Kenntnis der Inhaltskörper und der Membran der Characeen. Österr. Bot. Zeitschr., 1914, LXIV, S. 442.

[3]) S. J. Mayr, Über freie Eiweißkristalle im Endosperm der Samen von Loranthus europaeus. Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss. Math.-naturw. Kl. Abt. I, 1926, CXXXV, S. 409.

In zahlreichen Arbeiten hat O. Loew[1]) die Ansicht verfochten, daß es in den Pflanzen ein labiles Eiweiß gibt (s. Lebendfällung).

Der im Zellsaft, seltener im Cytopasma vieler Zellen vorkommende sehr labile Eiweißkörper wird zum Unterschied von gewöhnlichem Eiweiß durch Ammoniak und organische Basen aus seiner Lösung abgeschieden. Schwache Basen wie Koffein und Antipyrin können den labilen Charakter dieses Eiweiß tagelang intakt lassen. Die anfangs ausgeschiedenen minimalen Tröpfchen vereinigen sich allmählich zu ansehnlichen lichtbrechenden großen Tropfen (Proteosomen) (Loew).

In Rinden häuft sich im Winter labiles Eiweiß an, so daß im Rindenparenchym stark lichtbrechende Anhäufungen entstehen, die nach Kern[2]) eine große Analogie zu den Proteosomen zeigen, wie sie durch Koffeinlösungen entstehen. Aktives Reserveeiweiß kommt im Hopfen in besonderen Schläuchen vor[1]).

Ein Reagens, welches auf alle Eiweißkörper reagiert, besitzen wir naturgemäß nicht. Die gegenwärtig gebräuchlichen Reaktionen sind teils Fällungs-, teils Farbenreaktionen (die Koagulation sei einbegriffen). Zu den Fällungsreagentien zählen bekanntlich Weingeist (auch Chloroform, Äther, Benzol) und Azeton. Technisches Azeton fällt aus tierischen Eiweißlösungen (Milch, Blut) Eiweiß quantitativ (Th. Weil, Ber. chem. Ges., 1910, XLIII, S. 508) und gab Tunmann bei Pflanzen ebenfalls gute Resultate.

Die Eiweißstoffe werden aus ihren sauren, neutralen und alkalischen Lösungen ausgefällt durch Ferrichlorid, Kuprisulfat und -azetat, Merkurichlorid (fällt auch Peptone) u. a. Ferner fällen starke Mineralsäuren und die meisten Alkaloidreagentien.

Die Koagulation wurde von Bokorny[3]) zum Nachweis von Eiweiß benutzt. Am besten erfolgt diese, die nur bei schwach saurer Reaktion möglich ist, durch Erhitzen mit einprozentiger Essigsäure. Die Höhe der Koagulationstemperatur ist bei den einzelnen Eiweißkörpern verschieden. Durch Dialyse salzfrei gemachtes Eiweiß koaguliert nicht mehr durch Hitze. Doch tritt bei Zusatz von Chlornatrium zur erhitzten Lösung Koagulation ein. Bokorny hat aber sein Verfahren nur an „Proteosomen" (s. d.) und nur an 2 Objekten erprobt (Spirogyra und Echeveria), so daß ein eingehendes Studium dieser Reaktion noch

---

[1]) O. Loew, Über eine labile Eiweißform und ihre Beziehung zum lebenden Protoplasma. Biochem. Zeitschr., 1915, LXXI, S. 306. — Th. Bokorny, Neues zur Anatomie und Chemie des Hopfens; Eiweißschläuche in der Hopfenpflanze (Humulus lupulus). Zeitschr. ges. Brauwesen, 1928, LI, S. 167; Ref. Bot. Zentralbl. 1930, N. F., XV, S. 336.

[2]) A. Kern, Über den im Rindenparenchym gespeicherten Eiweißstoff. Beihefte z. bot. Centralbl., Abt. I, 1923, XL, S. 137.

[3]) Th. Bokorny, Über den mikrochemischen Nachweis von Eiweiß. Chem. Ztg., 1911, XXXV, S. 69.

aussteht. Hierbei wären die Erfahrungen von Spiro[1]) zu berücksichtigen, daß viele Körper die Hitzekoagulation der Eiweißstoffe hemmen und daß sich unter diesen gerade Substanzen finden, die häufig in den Zellen vrkommen (Cholin, Mannit, Zucker). Eine ausgedehnte Anwendung der Reaktion scheint somit mit Schwierigkeiten verbunden zu sein.

Von Wichtigkeit ist die Feststellung, ob koaguliertes (oder von vornherein in Wasser unlösliches) Eiweiß in Pepsin (0,5 g Pepsin, 100 g Wasser, 0,5 g Salzsäure) oder Trypsin (Trypsin 0,5 g, 50 g Wasser, 0,25 g Soda) löslich ist.

Wir wenden vorzugsweise Fällungsmittel an, welche gefärbte Reaktionsprodukte liefern, die im mikroskopischen Bilde schärfer hervortreten. Um Irrtümer auszuschließen, müssen die Schnitte vor Ausführung der im folgenden genannten Reaktionen in Wasser, dann in absolutem Alkohol aufgekocht werden. Außerdem erfahren die Objekte, da sehr viele Pflanzen Alkaloide führen, eine weitere Behandlung mit Weinsäure-Alkohol und mit Chloroform (zur Entfernung von Kautschuk und schwerlöslichen Fetten). Allgemein gültige Regeln lassen sich für die Vorbehandlung nicht geben; es müssen tunlichst alle ähnlich reagierenden Substanzen entfernt werden, sofern sie zu Täuschungen Anlaß geben können. Gute Reaktionen auf Eiweiß geben: Jodjodkalium, Eosin, Millons Reagens, dann folgen Salpetersäure und Pikrinsäure; weitere Reagentien liefern brauchbare Hilfsreaktionen. Bei einiger Übung wird man bereits bei positivem Ausfall einiger Reaktionen an vorbehandelten Schnitten auf Eiweiß schließen können.

Jodjodkalium (1,0 Jod, 3,0 Jodkalium, 100,0 Wasser) liefert die besten Resultate. Andere ebenfalls mit Jodjodkalium reagierende Substanzen lassen sich relativ leicht entfernen. Unbedingt erforderlich ist nur die Entfernung von im Zellsaft gelösten Stoffen.

Zur Eosinreaktion wird eine sehr verdünnte wässerige Lösung benutzt. Die Schnitte gelangen nach erfolgter Färbung in Glyzerin. Nach 1- bis 2-stündigem Verweilen in Glyzerin sind sie schön differenziert. Zuweilen ist die Stärke schwach gefärbt. Fette, Harze, Schleime, Gummi, Pektine bleiben ungefärbt. — Eiweißstoffe speichern begierig Anilinfarben (s. Kern). Aus Farbstoffgemischen eignen sich die genuinen Eiweißstoffe die sauren Farbstoffe an, während die Nukleoproteide (s. d.), resp. die in diesen enthaltenen Nukleine, die basischen Farbstoffe annehmen.

Vielfach benutzt wird Millons Reagens[2]). Es reagiert aber nicht mit allen Eiweißsubstanzen, sondern nur mit jenen, die Tyrosin enthalten

[1]) K. Spiro, Hofmeisters Beitr., 1903, IV, S. 300.
[2]) E. Millon, Compt. rend., 1849, XXVIII, S. 40.

(Empfindlichkeitsgrenze 1 : 20 000). Anderseits reagiert das Reagens auch mit vielen Phenolen und Phenolgruppen enthaltenden Stoffen, auch Gerbstoffen (vgl. S. 386) (Phenol rot, Resorcin, Hydrochinon, Pyrogallol bräunlich, Gallussäure rötlichbraun, ferner Vanillin, Eugenol u. a.). Nach Nickel[1]) wirkt das Reagens nicht nitrierend, sondern bildet unter dem Einfluß der salpetrigen Säure Nitrosokörper.

Millons Reagens wird bereitet durch Auflösen von 1 ccm Quecksilber in 9 ccm Salpetersäure (spez. Gew. 1,52), die Lösung wird mit dem gleichen Vol. Wasser verdünnt. Man kann auch nach Plugge[2]) 1 Gewichtsteil Quecksilber in 2 Gewichtsteilen Salpetersäure (spez. Gew. 1,42) lösen und die Lösung mit dem doppelten Vol. Wasser verdünnen. Millons Reagens zersetzt sich selbst bei guter Aufbewahrung nach einiger Zeit und wird unbrauchbar. Das Reagens kann durch Zusatz einiger Tropfen wässeriger Kaliumnitritlösung wieder brauchbar gemacht werden (Krasser[3]). Durch die im Reagens befindliche Salpetersäure wird aus Kaliumnitrit salpetrige Säure in Freiheit gesetzt.

Zur Ausführung der Reaktion werden die Präparate direkt in das Millonsche Reagens eingetragen. Nach einiger Zeit nehmen tyrosinführende Eiweißsubstanzen eine mehr oder weniger ziegelrote bis rosenrote Farbe an. Feste Eiweißkörper gehen hierbei nicht in Lösung. Durch gelindes Erwärmen wird die Reaktion beschleunigt. Will man in Wasser liegende Präparate prüfen, dann setzt man, um lästige Ausscheidungen zu verhindern, vor dem Zusatz des Millonschen Reagens einen Tropfen verdünnte Salpetersäure (1 : 50) zu.

Über die Verwendung von Millons Reagens zum makrochemischen Nachweis von Eiweiß s. S. 670.

Zeigt die Millonsche Reaktion die tyrosinführenden Eiweißkörper an, so kann man mit Hilfe der Chinonreaktion von Raciborski[4]) in geeigneten Fällen (Asparagus) die Aminosäuren der Fettsäurereihe (Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin, Arginin) nachweisen. Die Schnitte werden direkt auf dem Objektträger in eine konzentrierte wässerige Chinonlösung gelegt; es tritt sofort oder nach einigen Minuten, eventuell erst nach Er-

[1]) E. Nickel, Die Farbenreaktionen der Kohlenstoffverbindungen, Dissertation, Jena 1888.

[2]) P. C. Plugge, Salpetrige Säure haltiges Quecksilbernitrat als Reagens auf aromatische Körper mit einer Gruppe OH am Benzolkern, Arch. d. Pharm., 1890, CCXXVIII, S. 9.

[3]) Fr. Krasser, Unters. über d. Vorkommen von Eiweiß in der pflanzlichen Zellhaut, nebst Bemerkungen über den mikrochem. Nachw. d. Eiweißkörper, Sitzgsber. Wien. Akad., 1886, XCIV, 1, S. 118.

[4]) M. Raciborski, Beiträge zur botanischen Mikrochemie, Bull. de l'Ac. de Cracovie, 1906, S. 553.

wärmen, Rotfärbung ein. Die Reaktion verlangt eine kritische Beurteilung; Phenole und Phenolderivate, also Gerbstoffe und Phloroglucinderivate geben ebenfalls Rotfärbung, so daß man sich von dem Vorhandensein dieser Substanzen erst überzeugen muß, zudem soll die Reaktion bei Gegenwart von aromatischen Aminosäuren nicht auftreten. Auf diese Verhältnisse weist schon Raciborski hin. Nun müssen wir aber berücksichtigen, daß nach Schaer[1]) auch zahlreiche freie und in Chloralhydrat gelöste Alkaloide (Brucin, Morphin, Kodein, Strychnin, Veratrin, Koniin, Kokain, Atropin, Chinin) bei Chinonzusatz kirschrot werden, und daß die gleiche Färbung durch „zahlreiche alkalische Substanzen (namentlich alkalische Salze)" bewirkt wird.

Zu den zuverlässigsten Eiweißreaktionen zählt die Xanthoproteinreaktion mit Salpetersäure (Empfindlichkeitsgrenze 1 : 21 000)[2]). Die Reaktion wird unter Deckglas vorgenommen. Auf Zusatz von konzentrierter Salpetersäure werden Eiweißsubstanzen, die den Tyrosinkomplex führen, nach einiger Zeit tiefgelb (Xanthoproteinsäure). Erwärmen beschleunigt die Reaktion, ist aber nicht empfehlenswert. Saugt man einen Teil der Säure ab und fügt Ammoniak im Überschuß zu, dann nimmt die Färbung einen dunkleren Ton an und wird dunkelgelb, fast braun (Ammoniumxanthoprotein). De Wèvre[3]) nimmt eine etwas verdünnte Säure (3 Teile Säure + 1 Teil Wasser). Nickel fand, daß Harze, Alkaloide und einige oxyaromatische Verbindungen die gleiche Reaktion geben. Eine Verwechslung ist aber, selbst wenn diese Körper zuvor aus den Präparaten nicht entfernt sein sollten, nicht völlig ausgeschlossen. Den scharfen Übergang der gelben Farbe in Braungelb bei Ammoniakzusatz zeigen zwar nur die Eiweißstoffe; aber Farbenumschläge treten unter diesen Bedingungen bei vielen nitrierten aromatischen Verbindungen ein. Die Xanthoproteinreaktion ist für die Praxis brauchbarer als die Millonsche Reaktion; sie beruht auf Bildung von Nitroderivaten.

Pikrinsäure in konzentrierter wässeriger Lösung wirkt ebenfalls gut. Die vorbehandelten (alkaloidfreien) Schnitte verbleiben mehrere Stunden bis einen Tag in der Lösung und werden in Wasser oder Glyzerin untersucht.

Bei der Reaktion mit Phosphormolybdänsäure wird Eiweiß körnig gefällt und gelb gefärbt. Die Präparate kommen in eine Lösung von phosphor-

[1]) Ed. Schaer, Über das Verhalten der Alkaloide zu Chinon, Apoth. Ztg., 1911, XXVI, S. 831.

[2]) O. v. Fürth, Habilitationsschrift, Straßburg 1899.

[3]) A. de Wèvre, Recherches sur la technique microchimique des albuminoides, Bull. d. l. Soc. Belge de Microsc., 1894, XX, S. 91.

molybdänsaurem Natron in Salpetersäure (1 g phosphormolybdänsaures Natron in 90 g Wasser gelöst und mit 5 g konz. Salpetersäure versetzt; nach 1 Woche wird abfiltriert). Die Bildung des Niederschlages läßt sich im mikroskopischen Bilde verfolgen. Nach einiger Zeit werden die Schnitte blau. Die Reaktion ist als Hilfsreaktion brauchbar, besonders bei lebendem Material; sie ist sehr scharf und zeigt makrochemisch noch wenige μg an (Empfindlichkeitsgrenze 1 : 200 000).

Die Berlinerblau-Reaktion hat Zacharias[1]) benutzt. Die Pflanzenteile werden zunächst eine Stunde lang mazeriert in einer frisch bereiteteten Lösung von gelbem Blutlaugensalz (1 Teil 10proz. wässerige Lösung von Ferrocyankalium, 1 Teil Wasser und 1 Teil 50proz. Essigsäure). Alsdann werden die Objekte so lange mit stets zu erneuerndem 60proz. Weingeist ausgewaschen, als dieser noch sauer reagiert. Zusatz von verdünnter Ferrichloridlösung führt den vom Eiweiß gespeicherten Ferrocyanwasserstoff in Berlinerblau über (Empfindlichkeitsgrenze 1 : 90 000). Die Färbung hält sich längere Zeit in Glyzerin. In gleicher Weise reagieren verschiedene Membranen (Rizinussamen).

Auch Loew und Bokorny[2]) färbten Zytoplasma-Eiweiß der Spirogyren in ähnlicher Weise. Sie ließen die Spirogyren etwa eine Stunde in 0,1proz. Ammoniaklösung und brachten sie dann auf 12 Stunden in eine 10proz. wässerige Lösung von gelbem Blulaugensalz, der 5 % Essigsäure zugesetzt war. Nach Auswaschen mit Wasser kamen die Algen auf 12 Stunden in verdünnte Ferrichloridlösung.

Die Reaktion von Guezda mit ammoniakalischer Nickelsulfatlösung[3]) tritt gegen die erst angeführten Reaktionen an Brauchbarkeit zurück, schon weil die Eiweißstoffe hierbei teils gelb, teils blau werden. Letztere Farbe geht bei Zusatz von Kalilauge in Orangegelb über. Man mazeriert die Schnitte einige Stunden in einer konz. Lösung von Nickelsulfat, die mit Ammoniak gesättigt ist. Erwärmen beschleunigt und verschärft die Reaktion, die übrigens auch mit Gerbstoffen (Tannin, Catechu) erhalten wird. Die Färbung hält sich einige Zeit in Glyzerin.

Die Biuretreaktion, die rot- bis blauviolette Färbung gewisser Eiweißkörper mit Kupfersulfat in alkalischer Lösung, wurde schon von F. Rose und Mitscherlich[4]) beobachtet und von Sachs[5]) mikro-

[1]) E. Zacharias, Über Eiweiß, Nuklein u. Plastin, Bot. Ztg., 1883, XL, S. 209.

[2]) O. Loew u. Th. Bokorny, Über d. Verhalt. d. Pflanzenzellen zu stark verd. alkalischer Silberlösung, Bot. Centralbl., 1889, XXXIX, S. 369.

[3]) Auf unserem Gebiete eingeführt von Spencer Le Moore, Das angebliche Vorkommen von Eiweiß in den Wandungen der vegetabilischen Zellen, Chem. Zentralbl., 1892, II, Nr. 17.

[4]) F. Rose, Pogg. Ann. 1833, XXVIII, S. 132, C. G. Mitscherlich, Pogg. Ann., 1837, XL., S. 106.

[5]) J. Sachs, Über einige neue mikroskopische Reaktionsmethoden, Sitzgsber. Münch. Akad., 1859, XXXVI, S. 5.

chemisch verfolgt. Sie kommt nach Schiff[1]) jenen Eiweißstoffen zu, die ähnlich dem Biuret aufgebaut sind, so den Eiweißstoffen mit zwei $—CONH_2$-Gruppen; Albumine werden blauviolett (Empfindlichkeitsgrenze 1 : 2000 für Eiweißkörper, 1 : 100 000 für Peptone, Neumeister). Nicht zu zarte Präparate werden einige Zeit (nach de Wèvre 30 Minuten) in einer konzentrierten wässerigen Kupfersulfatlösung mazeriert, alsdann werden sie in Wasser gut abgespült und schließlich auf dem Objektträger in einen Tropfen konzentrierte Kalilauge (meist 50proz., auf 1 Stunde) gelegt. Eiweiß wird schmutzigrot bis blauviolett. Meist erhält man unklare Bilder, selbst dann, wenn man zuvor Zucker und Glykoside entfernt oder die Präparate mit Weingeist behandelt hat. Durch Erwärmen gewinnt die Reaktion etwas an Schärfe. Ein weiterer Nachteil der Reaktion besteht darin, daß die Färbungen weder in Wasser noch in Glyzerin haltbar sind, auch in Kalilauge nach kurzer Zeit (einigen Stunden) verblassen. Wie die isolierten Eiweißsubstanzen einen verschiedenen Farbenton bei der Reaktion zeigen (Maisalbumin und Kürbisvitellin violett, Erbsenlegumin mehr rot, Roggen- und Weizenfibrin mehr blau, Peptone purpurrot), so finden wir bei der mikrochemischen Reaktion ebenfalls verschiedene Farbentöne, die hier überdies wesentlich von der Dichte der betreffenden Eiweißkörper und der Stärke der Präparate abhängen. Zuweilen läßt sich diese Farbenreaktion besser mit bloßem Auge beurteilen, indem man das Präparat über eine weiße Unterlage hält. Mikroskopisch ist die Färbung schwieriger zu bestimmen. So zeigen die Eiweißstoffe der Kotyledonen von Amygdalus bei makroskopischer Betrachtung eine blaue Färbung mit einem Stich ins Violette, während man unter dem Mikroskop keine bestimmte Farbe erkennen kann. Wenig brauchbare Resultate gaben die Samen von Strychnos, Coffea, Myristica u. a. Jedenfalls ist die Biuretreaktion in der Mikrochemie weit weniger brauchbar als makrochemisch.

Die Xanthoprotein-Biuret- und Millonsche Reaktion wurden von Molisch[2]) zum makroskopischen Nachweis des Eiweiß benutzt.

Das zu untersuchende Blatt wird zunächst eine Minute in siedendes Wasser getaucht und dann in warmem, etwa 80 proz. Weingeist ausgezogen, bis das Blatt ganz weiß erscheint. Die so vorbehandelten Blätter werden zu den drei Reaktionen verwendet.

1. Xanthoproteinsäure-Reaktion. Man bringt das Blatt ½ bis 1 Stunde in eine mit 2 Vol. Wasser verdünnte Salpetersäure, bis der gelbe Ton seine größte Stärke erreicht hat und dann etwa 10 Minuten in mit 2 Vol. Wasser verdünntes Ammoniak. Es tritt dann intensiv kanariengelbe Färbung ein.

[1]) H. Schiff, Ber. Deutsch. chem. Ges., 1896, XXIX, 1, S. 298.

[2]) H. Molisch, Die Eiweißproben. makroskopisch angewendet auf Pflanzen. Zeitschr. f. Bot., 1916, VIII, S. 124.

2. Biuretprobe. Man legt das Blatt eine bis mehrere Stunden in eine 5 proz. Lösung von Kupfersulfat, spült einige Sekunden mit destilliertem Wasser ab und überträgt in 10 proz. wässerige Kalilauge. Die entsprechende Violettfärbung erreicht gewöhnlich nach mehreren Stunden den höchsten Grad.

3. Millonsche Reaktion. In Millons Reagens färbt sich das Blatt nach ½—1 Stunde intensiv ziegelrot.

Gut eignen sich zu diesen Reaktionen die Blätter von Tropaeolum majus, Phaseolus multiflorus, Brassica oleracea u. a. Aus den Reaktionen geht nach Molisch hervor, daß die Hauptmasse des Eiweißes der Blätter in den Chromatophoren steckt.

Nach W. Schumacher[1]) ist aber entgegen Molisch die Hauptmasse des Eiweiß nicht in den Chloroplasten lokalisiert, sondern das Zytoplasma ist es, das in der grünen Blattzelle die beherrschende Rolle im Eiweißstoffwechsel spielt.

Eine Reaktion des Tyrosins und Histidins ist die Diazoreaktion von Pauly. Über ihre Anwendung s. S. 288.

Die Aldehydreaktionen von Reichl und Mikosch[2]) sind in der Praxis, wie es scheint, recht wenig ausprobiert worden. de Wèvre bezeichnet speziell die Benzaldehyd-Reaktion als die am wenigsten empfindliche Eiweißreaktion; im allgemeinen liefern aber die Aldehydreaktionen als Hilfsreaktionen ganz brauchbare Resultate. Sie erfordern jedoch eine vorsichtige Beurteilung. Nachteile der Reaktion sind die lange Dauer der Ausführung (die Präparate müssen mehrere Stunden, oft 24 Stunden, mit dem betreffenden Aldehyd behandelt werden) und die starke Säure (welche die Präparate ziemlich schnell löst). Benutzt werden Anisaldehyd, Salizylaldehyd, Zimtaldehyd, Benzaldehyd, Vanillin in ½—1proz. weingeistigen Lösungen, in welchen die Präparate bis 24 Stunden belassen werden. Alsdann gelangen sie auf den Objektträger, werden mit Fließpapier abgetrocknet und unter Deckglas mit einer Mischung gleicher Volum. Wasser und Schwefelsäure, die einige Tropfen Ferrisulfat enthält, versetzt. Die Reaktion tritt oft nicht sofort ein, durch Erwärmen kann sie beschleunigt und verschärft werden. de Wèvre läßt nur 2 Stunden Benzaldehyd einwirken, trocknet ab und erwärmt auf dem Objektträger in 1—2 Tropfen Säure. Die Eiweißstoffe werden rot, violett und blau, nur bei Anwendung von Zimtaldehyd entstehen orangegelbe Farben. Bei diesen Reaktionen

[1]) W. Schumacher, Über die Beziehungen zwischen Eiweißgehalt und Chloroplastengröße in den Blättern von Pelargonium zonale, Jahrbücher wiss. Bot., 1929, LXX, S. 389.

[2]) C. Reichl, Eine neue Reaktion auf Eiweißkörper, Monatshefte f. Chem., 1889, X, 317 und Monatshefte f. Chem., 1890, XI, S. 155; C. Reichl u. C. Mikosch, Über Eiweißreaktionen und deren mikrochemische Anwendung, Jahresber. Oberrealschule, II. Bez., Wien, 1890, S. 34.

ist aber Grundbedingung, daß Alkaloide und Glykoside vorher aus den Präparaten entfernt werden, denn Coniferin wird hierbei blau, Veratrin violett, Solanin, Salicin, Narcein mehr oder weniger rot. Auch Spaltungsprodukte beeinflussen die Reaktion.

Die eisenhaltige Schwefelsäure ist durch Salzsäure ersetzbar; wenigstens ist dies bei der Vanillinreaktion der Fall. Winckel[1]) fand, daß Querschnitte fettreicher und Reservezellulose führender Samen mit Vanillinsalzsäure rotviolett werden, und vertrat die Ansicht, daß diese Reaktion durch Enzyme bedingt werde. Demgegenüber wies Rosenthaler[2]) darauf hin, daß Albumin, Globulin, Kasein, vor allem auch Tryptophan die Reaktion geben. Winckel konnte nicht ermitteln, welcher Teil des Querschnittes (Membran oder Zellinhalt) die violette Färbung annimmt. Tunmann[3]) stellte fest, daß Membran, Plasma und Öl ungefärbt bleiben und daß nur die Aleuronkörner nach längerer oder kürzerer Zeit eine violette bis rötliche Farbe annehmen. Es läßt sich dieser Befund sehr genau verfolgen, wenn man die Präparate direkt in Vanillinsalzsäure einträgt. Nach dem Absaugen des Reagens erzielt man mit Jodreagentien weitere Eiweißreaktionen. Die Vanillinsalzsäurefärbung ist somit eine Eiweißreaktion, die Tryptophangruppen anzeigt (Rosenthaler). Sie hat vor der Reaktion von Reichl-Mikosch den Vorzug, daß die Präparate durch die Säure nicht gelöst werden. Übrigens gibt Hühnerei-Albumin ebenfalls eine violette Reaktion mit Vanillinsalzsäure[4]) Bemerkt sei schließlich, daß nach mehrfachen Versuchen Salzsäure allein die Reaktion bei gewöhnlicher Temperatur selbst nach 24 Stunden nicht hervorruft. Erhitzt man aber mit starker Salzsäure, dann entsteht, wie auch Correns[5]) angibt, zuweilen eine rötliche Färbung, die aber nicht gleichmäßig erscheint und wahrscheinlich sehr von der angewendeten Temperatur beeinflußt wird. Salzsäure gibt mit verschiedenen Alkaloiden und Glykosiden ebenfalls Rotfärbung (Physostigmin, Solanin, Veratrin, Convallamarin u. a.).

Zum Nachweis von Eiweiß in Umbelliferenfrüchten setzt Pfeiffer[6]) weingeistige Vanillinlösung zu den Präparaten und nach dem Eintrocknen eine Mischung gleicher Teile konzentrierter Schwefelsäure und Methylgrün-Glyzerinlösung. Das Eiweiß wird rot, Kerne und Zellmembranen erscheinen blau.

[1]) W. Winckel, Anwendung der Vanillinsalzsäurereaktion zum Nachweis von Fermenten, Apoth. Ztg., 1905, XX, S. 209.

[2]) L. Rosenthaler, Vanillinsalzsäure als Reagens auf Eiweiß und Tryptophan, Apoth.-Ztg., 1907, XXII, S. 678.

[3]) O. Tunmann, Untersuchungen über die Aleuronkörner einiger Samen, Pharm. Zentralh., 1909, L, S. 525.

[4]) C. Reichard, Farbenreakt. d. Eiweißkörper, Eier-Albumin, Pharm.-Ztg., 1910, LV, Nr. 16.

[5]) C. Correns, Über die vegetabilischen Zellmembranen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1894, XXVI, S. 600.

[6]) H. Pfeiffer, Zur Methode der mikroskopischen Anatomie ruhender Umbelliferenfrüchte, Mikrokosmos, 1918/19, I, S. 8.

Die Tryptophangruppe gibt ferner eine rotviolette Färbung mit Dimethylaminobenzaldehyd und Salzsäure; sie geht durch Nitrit in Blau über.

Die von Raspail[1]) 1829 aufgefundene Farbenreaktion, die früher häufig zum Eiweißnachweis benutzt wurde, verdient nur historisches Interesse. Versetzt man Präparate mit einer konzentrierten wässerigen Rohrzuckerlösung und läßt Schwefelsäure einwirken, dann färben sich viele Eiweißstoffe rot bis violett. Es färben sich nun nicht alle Eiweißstoffe, und dann reagieren bekanntlich manche Glykoside, Alkaloide, Gerbstoffe u. a. in gleicher Weise. So werden von Rohrzucker und Schwefelsäure mehr oder weniger rot: Phenol, Brenzkatechin, Pyrogallol, Resorcin. Pyrrol; Phloroglucin wird gelbrot, beim Erwärmen rotbraun. Bei dieser Unsicherheit sieht man am besten ganz von der Reaktion ab. Der zur Reaktion nötige Zucker ist übrigens sehr oft in den Objekten enthalten (im Endosperm vieler Samen, Coffea, Strychnos), so daß Schwefelsäure allein die Raspailsche Reaktion hervorruft. In solchen Fällen kann die Reaktion nebenher als Fingerzeig dienen. Doch müssen dann Kontrollversuche mit Präparaten ausgeführt werden, denen der Zucker durch gutes Auswaschen mit warmem Wasser entzogen ist. Hierbei bleibt Voraussetzung, daß andere mit Schwefelsäure rot werdende Substanzen fehlen. Nach Mylius[2]) beruht die Reaktion auf Furfurolbildung (richtiger auf der Bildung von Oxymethylfurfurol).

Die Mesnardsche Reaktion[3]), auf Tryptophanabspaltung beruhend, färbt Eiweißstoffe ebenfalls rot, ist mit den gleichen Nachteilen behaftet wie die von Raspail, schont jedoch die Präparate. Die Schnitte werden auf das Deckglas in einen Hängetropfen von stark zuckerhaltigem Glyzerin gebracht und den Dämpfen einer konzentrierten Salzsäure ausgesetzt. Es kann die auf S. 342 beschriebene Vorrichtung benutzt werden, oder man bringt den Glyzerintropfen auf einen Objektträger, trägt die Präparate ein und hält den Objektträger über die Öffnung der Salzsäureflasche.

Die Reaktion von Adamkiewicz[4]), Eintragen der Schnitte in einen Tropfen eines Gemisches von gleichen Vol. konz. Schwefelsäure und Eisessig[5]), die durch Erwärmen beschleunigt werden kann, ruft meist nur eine sehr schwache Rötung hervor; zuweilen bleibt die Reaktion, die auf der Gegenwart der Tryptophangruppe beruht, ganz aus und ist ebensowenig beweisend wie die Alloxan-Reaktion Krassers (Sitzgsb. Wien. Akad., 1886, XCIV, S. 135. Eingetrocknete Schnitte

[1]) Raspail, Annales des sciences d'observation, 1829, I, S. 72 und: Chimie organique, 1839, II, S. 139. Unabhängig von Raspail hat M. Schultze die gleiche Reaktion gefunden, Ann. d. Chem. u. Pharm., LXXI, S. 139.

[2]) Mylius, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1887, XI, S. 493.

[3]) E. Mesnard, Recherches sur la localisation des huiles grasses dans la germination des graines, Compt. rend., 1893, CXVI, S. 111.

[4]) Adamkiewicz, Ber. Deutsch. chem. Ges., 1875, VIII, I, S. 161.

[5]) Die käufliche Säure enthält stets Glyoxylsäure, welche die Reaktion veranlaßt.

werden mit einer konz. wässerigen oder weingeistigen Lösung von Alloxan versetzt, Rotfärbung). Über die Reaktion von Axenfeld s. Aleuronfärbung.

Die Reaktion mit α-Naphthol (Thymol) und Schwefelsäure, die Molisch für Zucker (S. 290) empfahl, gibt mit Eiweißkörpern eine violette (rote) Färbung, die auf Zusatz von Weingeist, Äther oder Kalilauge in Gelb übergeht (Seegen). — Bei pflanzlichen Geweben wird sie nicht benutzt. — Auch die Schwefelblei-Reaktion wird kaum benutzt. Da fast alle Eiweißkörper schwefelhaltig sind, so entsteht beim Kochen mit Kalilauge und einem Bleisalze ein schwarzer Niederschlag oder doch eine Braunfärbung.

Ob der Inhalt des einschichtigen Perisperms des Acorus-Samens aus einer eiweißartigen Substanz besteht, wie Mücke[1]) meint, erscheint noch fraglich. Der strukturlose Inhalt wird mit Chlorzinkjod braunrot und löst sich langsam, Jodjodkalium färbt braunrot, bei nachfolgendem Schwefelsäurezusatz erfolgt blauviolette Lösung. Sonst erwies sich der Inhalt unlöslich, so in Eau de Javelle(!), Chloralhydrat, Kalilauge, Ammoniak, färbte sich aber in frisch bereiteter Millonscher Lösung rosarot und löste sich anderseits in Kupferoxydammoniak. Bei der Hydrolyse mit Salzsäure entstand kein Zucker.

Zum Nachweis der Kleber liefernden Eiweißstoffe (protides gluténogènes) verwendet Bruère[2]) Bromkresol-Grün, Bromkresol-Purpur und Phenosafranin (0,01 g auf 20 ccm neutralen 60proz. Weingeist). Bromkresol-Grün färbt die genannten Eiweißstoffe blau. Phenosafranin blauviolett, während es gleichzeitig die Zellulose-Gele lebhaft rosa oder orange färbt.

Zum Nachweis von Eiweiß in Zellwänden schlägt Wood[3]) folgendes Verfahren ein: Die Schnitte werden in einem besonderen Apparat chloriert. Nach Absaugen des überschüssigen Chlors werden die Schnitte gut mit Wasser gewaschen und dann mit 10proz. Natriumbiphosphatlösung behandelt (um Spuren von Eisen in das Phosphat zu verwandeln), nochmals gewaschen und dann in 5proz. Kaliumjodidlösung gelegt. Infolge der Chloraminreaktion wird Jod frei, das Gelbfärbung hervorruft, wenn Eiweiß vorhanden war. Spuren von Jod können mit löslicher Stärke nachgewiesen werden. Es handelt sich in allen Fällen nur um Spuren von Eiweiß.

Nukleoproteide

Von den zusammengesetzten Eiweißverbindungen (den Proteiden, S. 663) sind die Nukleoproteide hauptsächlich als Bestandteile der Zellkerne in mikro-

---

[1]) M. Mücke, Über den Bau u. d. Entw. der Früchte u. über d. Herkunft von Acorus calamus L., Bot. Ztg., 1908, LXVI, S. 1.

[2]) P. Bruère, Micro-réactions colorimétriques des protides gluténogènes et des gels cellulosiques du grain de blé, Compt. rend. Acad. sciences, 1930, CXCI, S. 792.

[3]) F. M. Wood, Further investigations of the chemical nature of the cell-membrane, Annals of botany, 1926, XL, S. 547.

chemischer Hinsicht am meisten studiert worden. Sie zeichnen sich durch hohen Phosphorgehalt aus und speichern bestimmte Anilinfarben, weshalb man sie mikrochemisch als Chromatin zusammengefaßt hat. Bei der Behandlung mit Pepsinsalzsäure geben die Nukleoproteide einen unlöslichen Rückstand, den man als Nuklein bezeichnet und der den gesamten Phosphor (nach Altmann bis zu 9%) enthält. Die Nukleine wiederum spalten sich in Eiweißkomplexe und phosphorhaltige Nukleinsäuren. Durch Spaltung mit Säuren zerfallen die Nukleinsäuren in Phosphorsäure, Pentosen, Purinbasen und Pyrimidinbasen.

Auf botanischem Gebiet wurde zuerst von Zacharias[1]) die Unlöslichkeit der Nukleine in Pepsinsalzsäure (künstlicher Magensaft) zum mikrochemischen Nachweis der Nukleoproteide benutzt. In Pepsinsalzsäure, auch in 0,1—0,3proz. Salzsäure, nehmen die Nukleine ein scharf umschriebenes glänzendes Aussehen an. Sie lösen sich ferner in 10proz. Chlornatriumlösung, in konzentrierter Natriumkarbonatlösung, verdünnter Kalilauge, konzentrierter Salzsäure u. a. Später hat Zacharias zum Teil andere Befunde erhalten[2]): „Nach verschiedenartiger Vorbehandlung werden die Chromatinmassen gelöst von konzentrierter Salzsäure und verdünnter Kalilauge, zur Quellung gebracht durch ammoniakalische Karminlösung, Glaubersalzlösung und Kochsalzlösungen verschiedener Konzentration. Verdünnte Sodalösungen wirken in verschiedener Konzentration in differentem Grade quellend und lösend Destilliertes Wasser, auf frisches Material einwirkend, läßt die Chromatinkörper aufquellen." Die Kerne und Nukleolen der Florideen Antithamnion cruciatum und plumula verhalten sich nach Schiller[3]) gegen 10proz. Chlornatriumlösung, konzentrierte Natriumkarbonatlösung und 0,3proz. Salzsäure wie die Kerne der höheren Pflanze.

Als Nukleinreagens wurde 50proz. Chromsäure bei Spirogyra benutzt. Zunächst bleibt das Kerngerüst widerstandsfähig gegen Chromsäure, löst sich aber nach einiger Zeit, während die Nukleolen zurückbleiben; nun tritt ein Fadengerüst hervor, welches lange sichtbar bleibt und erst nach dem Auflösen der Wand verschwindet. van Wisselingh[4]) hat die Reaktion mit 50proz. Chromsäure an mit Flemmingschem Gemisch fixierten Spirogyren erprobt und empfiehlt sie zum Studium der Karyokinese, später auch für andere Objekte (Fritillaria imperialis, Leucojum aestivum)[5]). Bei diesen soll man gute Einblicke erhalten,

[1]) E. Zacharias, Über Eiweiß, Nuklein und Plastin, Bot. Ztg., 1883, S. 209.

[2]) E. Zacharias, Die chemische Beschaffenheit von Protoplasma und Zellkern, Progressus rei bot., 1909, III, S. 222.

[3]) J. Schiller, Die Kerne von Antithamnion cruciatum f. tenuissima Hauck und Antithamnion plumula (Ellis) Thur., Jahrb. f. wiss. Bot., 1911, XLIX, S. 269.

[4]) C. van Wisselingh, Über den Nukleolus von Spirogyra, Bot. Ztg., 1898, LVI, S. 196.

[5]) C. van Wisselingh, Über das Kerngerüst, Bot. Ztg., 1899, LVII, S. 155.

wenn man die Chromsäurewirkung unterbricht. Die Chromsäure wird mit destilliertem Wasser ausgewaschen, die Kerne, die in der Säure aufgequollen sind, werden etwas kleiner. Fügt man dann „eine nicht zu starke, mit Essigsäure schwach angesäuerte Lösung von Brillantblau extra grünlich (Bayer-Elberfeld) hinzu, so wird das Gerüst oder dessen Rest blau gefärbt".

Ähnliche Resultate liefert Erhitzen der Präparate in Wasser oder in Glyzerin in zugeschmolzenen Glasröhrchen (Glyzerinmethode van Wisselinghs). Das mit Weingeist fixierte Material (mit Flemmingscher Lösung fixiertes ist ungeeignet) kommt nach dem Abtrocknen mit Fließpapier in 1—2 mm weite, 6 cm lange Glasröhrchen, die etwas Glyzerin oder Wasser enthalten und nach dem Beschicken zugeschmolzen werden (Apparat s. unter Chitin). Die Glasröhrchen werden im Ölbade mit Glyzerin auf 230—250°, mit Wasser auf 140—150° erhitzt. Nun werden die Gläschen in der Nähe der Flüssigkeit durchschnitten, mit Wasser aufgefüllt, umgekehrt und mit dem offenen Ende in Wasser (auf dem Uhrglase oder dem Objektträger) getaucht. Derart lassen sich die Präparate leicht aus dem Glasröhrchen herausbringen. Bei der Glyzerinmethode wird „zuerst das Zytoplasma gelöst, darauf die Kernwand und die Kernkörperchen, während das Kerngerüst und die aus demselben entstandenen karyokinetischen Figuren am längsten Widerstand leisten".

Wie schon erwähnt (S. 665), speichern die Nukleoproteide begierig gewisse Anilinfarben, und zwar aus Farbstoffgemischen die basischen Farbstoffe, so aus Fuchsin-Methylenblau (s. Zellkern) den blauen, aus Fuchsin-Jodgrün den grünen Farbstoff (Cyanophilie Auerbachs). Diese Färbungen werden, ob mit Berechtigung bleibe dahingestellt, von vielen Autoren als „chemische" Reaktionen auf Nukleoproteide angesehen. Man ist verschiedentlich der Ansicht, daß die Intensität der Färbung einen Schluß auf die Menge der anwesenden Nukleine gestattet[1]). Auch wollte man aus den Färbungen sogar auf verschiedenartige Nukleoproteide schließen (?).

Besonders wurde Methylgrünessigsäure von Carnoy[2]) zum Nachweis von Nuklein wiederholt benutzt. Von deutschen Autoren beschäftigte sich Zacharias[3]) eingehend mit diesem Reagens und gab bereits 1882 an, daß in den Kernen von Phajuswurzeln nach Behandlung mit künstlichem Magensaft durch Methylgrünessigsäure (Methyl-

[1]) L. Lilienfeld, Über die Wahlverwandtschaft der Zellelemente zu gewissen Farbstoffen, Verh. physiol. Ges. Berlin, 1892/93, Nr. 11.

[2]) Carnoy, La Biologie cellulaire, Lierre, 1884, S. 211. — Carnoy et Lebrun, La Cellule, 1897, XII.

[3]) E. Zacharias, Über den Zellkern, Bot. Ztg., 1882, XL, S. 656.

grünlösung, die auf 100 g Wasser 1 g reine konzentrierte Essigsäure enthält) nur die Nukleinkörper gefärbt werden. Später[1]) behandelte er frische Epidermen der Blätter von Tradescantia und von Leucojum aestivum (letztere auch nachdem sie 48 Stunden in Weingeist gelegen hatten und nachher mit Wasser abgespült waren) mit Methylgrünessigsäure und fand, daß die Leukoplasten sofort verquellen, während die nukleinhaltigen Teile der Kerne sich mehr oder weniger stark färben. Eine schärfere und schnellere Färbung soll eintreten, wenn man die Präparate zuvor auf einen Tag in 0,3proz. Salzsäure einlegt und mit Wasser abspült. Diese Angabe wurde von Heine[2]) für basische Farbstoffe in Abrede gestellt, nach dem im Gegenteil die Vorbehandlung mit verdünnter Salzsäure die Empfänglichkeit der Nukleoproteide für Farbstoffe herabsetzen soll.

Miescher[3]) verneinte auf Grund seiner Erfahrungen mit Spermatozoen des Rheinlachses die Färbbarkeit des Nukleins mit Methylgrün. Er benutzte eine Flüssigkeit, die 1% Essigsäure, 9—10% Glaubersalz und ziemlich viel Methylgrün enthielt. Die dicke Hülle des Kopfes, welche Sitz der Nukleinsäure sein soll, färbte sich gar nicht oder nur schwach, während der Innenraum prächtig gefärbt hervortrat. An dem gleichen Objekte kam Zacharias[4]) zu einem anderen Resultat bei Ersatz des Methylgrüns durch Fuchsin S.; Zacharias hatte wiederholt Methylgrünessigsäure zum Nachweis von Nuklein empfohlen[5]) und auch über die Einwirkung von Glaubersalz-Methylgrünessigsäure Versuche angestellt an den Epidermen von Tradescantia virginica, Orchis latifolia und Leucojum aestivum. Die Erfolge waren verschieden, je nachdem frisches oder Alkohol-Material benutzt wurde.

Später sagt Zacharias (Lit. S. 674, 2) von den Chromatinmassen: „Nach der Behandlung mit verdünnter Salzsäure oder Magensaft färben sie sich in einem Gemisch von Methylenblau und Fuchsin S blau. Frisch oder nach Behandlung mit Alkohol, verdünnter Salzsäure oder Magensaft in Methylgrünessigsäure eingetragen, färben sie sich intensiv grün, ohne zu quellen, desgleichen färben sie sich nach entsprechender Behandlung mit Essigkarmin."

[1]) E. Zacharias, Über einige mikrochemische Untersuchungsmethoden, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1896, XIV, S. 270.

[2]) L. Heine, Die Mikrochemie der Mitose, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1896, XXI, S. 494.

[3]) Miescher, Physiol.-chem. Untersuch. über die Lachsmilch, herausgegeb. von O. Schmiedeberg, Leipzig 1896.

[4]) E. Zacharias, Beiträge z. Kenntnis der Sexualzellen, Ber. d. bot. Ges., 1901, XIX, S. 377.

[5]) E. Zacharias, Über Nachweis und Vorkommen von Nuklein, Ber. d. Deutsch. bot. Ges., 1898, XVI, S. 185.

Das Chromatin kann selbstverständlich keine Substanz von feststehenden chemischen und physikalischen Eigenschaften sein (s. Zellkern). Während der Entwicklungsperioden des Zellkerns wird es mannigfache Umsetzungen erfahren. Auf mikrochemischem Wege hat hierfür Němec[1]) Belege beigebracht. Von den nukleinreichen Chromosomen nahm man lange Zeit an, daß sie sich ebenso wie die Chromatinkörperchen des ruhenden Kernes verhalten. Taucht man jedoch frische meristematische Zellen (lebende Wurzelspitzen, Vicia faba, Allium cepa) auf 30 Sekunden bis 5 Minuten in siedendes Waser, dann sind die Chromosomen ausgehöhlt oder ganz aufgelöst, während die ruhenden Kerne und Chromatinkörperchen kaum angegriffen werden und ihre Färbungskraft behalten. Die Chromosomen lösen sich ferner fast ganz bei 24stündigem Behandeln mit 1proz. wässeriger Kalilauge. Hier ist somit der Satz A. Fischers[2]) sicher begründet: „Der Begriff des Chromatins kann der morphologischen Merkmale nicht entbehren.“ Wie vorsichtig man bei allen Reaktionen in den Schlußfolgerungen sein muß, geht daraus hervor, daß Zacharias bei Spirogyra zu einem falschen Ergebnis kam. Tröndle[3]) konnte zeigen, daß der Nukleolus von Spirogyra Sitz des Chromatins ist; er untersuchte außerdem Fritillaria, Vicia faba und Pinus, und zwar mit Eiweißreagentien (Millon rot, Jodjodkalium braungelb), Alkalien, Säuren und heißem Wasser.

Kossel[4]) unterscheidet in der Chromatinsubstanz der Zellkerne zwei verschiedene Anteile; der eine ist reich an gebundener Phosphorsäure und hat saure Eigenschaften, der andere ist ein Eiweißkörper mit basischen Eigenschaften.

Da die Nukleoproteide stets Phosphor führen, so hat man sie mit Hilfe dieses Stoffes ebenfalls nachzuweisen versucht. Die hierbei in Anwendung kommenden Methoden über den Phosphornachweis s. S. 147.

Thymonukleinsäure

Zu einem mikrochemischen Nachweis einer Thymonukleinsäure taucht man die Präparate kurz in kalte N/1-Salzsäure und bringt sie dann 4—5 Minuten in die bereits auf 60° vorgewärmte und bei dieser Temperatur zu erhaltende Salzsäure derselben Konzentration. Man

[1]) B. Němec, Zur Mikrochemie der Chromosomen, Ber. d. Deutsch. bot. Ges., 1909, XXVII, S. 43.

[2]) A. Fischer, Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas, Jena 1899, S. 191.

[3]) A. Tröndle, Der Nukleolus von Spirogyra und die Chromosomen höherer Pflanzen, Zeitschr. f. Bot., 1912, IV, S. 721.

[4]) A. Kossel, Über die chemische Beschaffenheit des Zellkernes, Nobelvortrag, Naturw. Rundsch., 1911, XXVI, S. 221.

bringt dann etwa 3 Stunden in fuchsinschweflige Säure[1]) (Feulgen-Brauns)[2]). Bei bejahendem Ausfall tritt Violettfärbung ein (Nukleal-Reaktion.

Erhitzt man 1 Teil 0,5proz. Lösung von thymonukleinsaurem Natrium mit 2 Teilen einer Mischung von 1 Teil konzentrierter Schwefelsäure und 39 Teilen einer 1proz. Lösung von Diphenylamin in Eisessig ½ Stunde im siedenden Wasserbad, so tritt Blaufärbung ein (Dische)[3]).

Plastin

Die hochzusammengesetzten Proteide des Protoplasmas sind noch sehr wenig erforscht. Reinke[4]) hat aus den Plasmodien von Aethalium septicum einen in Wasser und Alkohol unlöslichen Stoff, Plastin, dargestellt. Plastin führt Schwefel und Phosphor. „Die Verwandtschaft des Plastins mit den Nukleinen wird durch seinen Phosphorgehalt dargetan", von denen es sich anderseits „durch seine Unlöslichkeit in verd. Alkalien" unterscheidet. Plastin soll die chemische Grundlage des lebenden Protoplasmas sein. Loew[5]) bezweifelt die Reinheit des von Reinke und seinen Mitarbeitern isolierten Plastins. Růžička[6]) zählt es zur Gruppe der Albuminoide; das im Plasma und im Kern anwesende Plastin ist sozusagen als Vorläufer der Albuminoide anzusehen. Hierfür sollen weitgehende Übereinstimmungen mit dem Keratin und dem Neurokeratin sprechen.

Plastin wird ebenso wie Nuklein von Pepsinsalzsäure nicht angegriffen; beide Substanzen lösen sich in konzentrierter Salzsäure. Doch unterscheidet sich das Plastin von den Nukleinen dadurch, daß es in 10proz. Chlornatriumlösung nach Vorbehandlung mit Pepsinsalzsäure nicht verquillt und von verdünnter Salzsäure (4 + 3) nicht gelöst wird. Es bleibt also nach Entfernung verdaulicher Eiweißkörper aus den Nukleolen durch künstlichen Magensaft im Verdauungs-

[1]) Die Lösung von 1 g Fuchsin in 200 ccm siedendem Wasser wird nach Abkühlung auf 50° filtriert und mit 20 ccm N/1-Salzsäure versetzt. Nach weiterem Abkühlen auf 25° wird 1 g Natriumbisulfit (siccum pro analysi) zugesetzt und bis zur völligen Entfärbung stehen gelassen.

[2]) F. Feulgen-Brauns, Untersuchungen über die Nuklealfärbung, Pflügers Archiv f. d. ges. Physiologie, 1924, CCIII, S. 415.

[3]) Z. Dische, Über einige neue charakteristische Farbenreaktionen der Thymonukleinsäure usw., Mikrochemie, 1930. VIII, S. 4; hier auch weitere Literatur und Beschreibung mehrerer Farbenreaktionen.

[4]) J. Reinke u. H. Rodewald, Die chemische Zusammens. d. Protoplasmas von Aethalium septicum, auch: Unters. Bot. Inst. Göttingen, 1881—83.

[5]) O. Loew, Bot. Ztg., 1884, XLII, S. 113.

[6]) V. Růžička, Zur Kenntnis der Natur und Bedeutung des Plastins, Arch. f. Zellforsch. München, 1908, I, 4. Heft, S. 587.

rest Plastin zurück. In Alkalien löst sich Plastin schwerer als Nuklein (Zacharias)[1].

Nach Němec[2]) bestehen die Spindelfasern aus Plastin, doch soll dies nach Zacharias nur in bestimmten Fällen zutreffen. Unter der Bezeichnung „Plastin" faßt Zacharias alle Bestandteile von Protoplasma, Zellkern und Chromatophoren zusammen, welche sich durch die oben angeführten Reaktionen auszeichnen.

Andere Eigenschaften wie das Plastin des Cytoplasmas (Cytoplastin) besitzt das Linin-Karyoplastin (das sogenannte achromatische Kerngerüst). Zu diesem Nachweis eignen sich nach Němec[3]) mit Weingeist fixierte oder mit Pikrineisessigschwefelsäure fixierte und mit Weingeist entfärbte Objekte. Am Objektträger aufgeklebte Schnitte kommen auf 24 Stunden in 1proz. wässerige Kalilauge. Cytoplasma, Nukleolen und die Fasern der Teilungsspindel sind ungelöst, der sonstige Kerninhalt ist aber vollständig verschwunden.

Nach Kiesel[4]) ist das Plastin von Reinke und anderer früherer Forscher ein Gemisch, dessen Hauptbestandteil neben einem bei starker Säurehydrolyse Glykose liefernden, der Zellulose in Widerstandsfähigkeit gegen Säuren und Alkalien nahestehenden Polysaccharid (Myxoglukosan) ein Eiweißstoff ist, der nur durch energische Behandlung mit Alkalien in Lösung geht. Der Name Plastin soll nur noch für diesen Eiweißstoff beibehalten werden, der in Begleitung des Myxoglukosans erst die Hüllen der vegetativen Plasmodiumstränge und dann die Skelettsubstanz der Fruchtkörper bildet. Kiesel ist ferner der Ansicht, der auch Reinke unter Verlassen seiner ursprünglichen beitritt, daß das Plastin keine spezifische, in jedem Protoplasma enthaltene Grundlage derselben ist. Das Kieselsche Plastin wird von Pepsinsalzsäure angegriffen.

Volutin

Seit den Untersuchungen von Ernst[5]), der körnchenförmige Einschlüsse in den Bakterien beschrieb, die Farbstoffe leicht und intensiv speichern, sind ähn-

---

[1]) E. Zacharias, Über Eiweiß, Nuklein und Plastin, Bot. Ztg., 1883, XLI, S. 209.

[2]) B. Němec, Neue cytologische Studien, Fünfstücks Beitr. z. wiss. Bot., 1900, IV_1, S. 83.

[3]) B. Němec, Zur Mikrochemie der Chromosomen, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1909, XXVII, S. 43.

[4]) A. Kiesel, Untersuchungen über die Skelettsubstanz der Fruchtkörper der Myxomyceten und die Beziehung des Plastins zur Bildung derselben, Planta, 1926, II, S. 44. S. auch Zeitschr. physiol. Chem., 1925, CL, S. 172 und Protoplasma, 1929, VI, S. 332.

[5]) P. Ernst, Über d. Bazillus der Xerose und seine Sporenbildung, Zeitschr. f. Hyg., 1888, IV.

liche Bildungen vielfach studiert worden, so von Bütschli[1]) bei Oscillarien, von Lauterborn[2]) bei Diatomeen und Desmidiaceen u. a. A. Meyer[3]) lieferte im Verein mit mehreren Schülern den Beweis, daß alle diese Gebilde aus der gleichen Substanz bestehen, die er Volutin nennt. Wahrscheinlich gibt es mehrere Stoffe ähnlicher Zusammensetzung. Nach den vorliegenden Untersuchungen kann es als sicher gelten, daß die Volutine der Hauptsache nach aus einer Verbindung der Nukleinsäure bestehen[4]).

Sumbal[5]) verglich Nuklein und das Chromatin der Froscherythrocyten mit Volutin und konnte keine wesentlichen Unterschiede feststellen.

Selten tritt Volutin[6]) in Form kugelförmiger Sphärite auf, die auch durch Verwachsung rundliche stumpfhöckerige, in einzelnen Fällen hohle Gebilde liefern können. In den Bakterien kommt das Volutin „in Form kleiner farbloser, amorpher, im Cytoplasma liegender Massen vor, welche etwas stärker als das Cytoplasma, etwas schwächer als die Fetttropfen lichtbrechend sind“ (A. Meyer). Die amorphen Volutinmassen sind steifbreiig oder sehr zähflüssig. Größe zwischen 0,2 und 6 μ.

Volutin kommt meist im Cytoplasma, seltener in Vakuolen (Aspergillus, Pinnularia), vereinzelt in Chloroplasten, doch nie in den Zellkernen vor.

Vielleicht entsteht es in Autoplasten. Volutin gehört zu den Reservestoffen, da Nukleinsäure Stickstoff und Phosphor führt. Volutin ist sehr verbreitet bei Pilzen[7]), ferner bei Nostocaceen, Peridineen, Diatomeen (dort doppelbrechend), Desmidiaceen, Chlorophyceen, Phaeophyceen, Rhodophyceen, hingegen nicht bei Archegoniaten, Gymnospermen und Angiospermen. Doch hat es A. Meyer für

[1]) O. Bütschli, Über den Bau der Bakterien und verwandter Organismen, Leipzig 1890 und: Weitere Ausführungen über den Bau der Cyanophyceen und Bakterien, Leipzig 1896.

[2]) R. Lauterborn, Untersuchungen über Bau, Kernteilung und Bewegung der Diatomeen, Leipzig 1896.

[3]) A. Meyer, Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins, Bot. Ztg., 1904, LXII, S. 113.

[4]) M. A. van Herwerden, Over den aard en de beteekenis der volutine in gistcellen. Verslag van de gewone vergaderingen der wis- en natuurkundige afdeeling, Kon. Akad. van Wetenschappen te Amsterdam, 1917, XXV, S. 1445; Ref. Bot. Zentralbl., 1918, CXXXVII, S. 41.

[5]) Jar. Sumbal, Über das Volutin, Chromatin und Nuklein, Zeitschr. allg. Physiol., 1913, XV, S. 456.

[6]) Über die Verbreitung des Volutins s. A. Meyer, Morphologische und physiologische Analyse der Zellen, S. 184.

[7]) R. Burri und J. Thöni fanden Volutin auch in Milchsäurebakterien (Zentralbl. f. Bakt., 1909, XXIII, S. 32).

die Globoide der Aleuronkörner von Rizinus und Cucurbita angegeben. Die in der Hefe sich metachromatisch färbenden Stoffe sind i. A. mit dem Volutin von A. Meyer identisch (Henneberg)[1].

Volutin löst sich in heißem Wasser, konzentrierter Salpetersäure, 5proz. Salz- und Schwefelsäure, 2proz. Kalilauge, Eau de Javelle; Pepsin und Trypsin lösen nicht rascher als Wasser. Chloral löst erst bei tagelanger Einwirkung. Absoluter Alkohol fixiert bei längerer Einwirkung, ebenso Formaldehyd und Pikrinsäure. Biuret- und Millonreaktion negativ.

Volutin färbt sich mit Jodjodkalium und mit Chlorzinkjod nur jodgelb. Mit Osmiumsäure (1 $^0/_0$), Vanillinsalzsäure (30 ccm Salzsäure, 5 ccm Wasser, 0,05 g Vanillin), Rohrzuckersirup-Schwefelsäure, Fehling (Kupfersulfat-Seignettesalz-Kalilauge), Millons Reagens (Quecksilber 10 g, Salpetersäure 10 g, Wasser 20 ccm) treten keine Farbenerscheinungen auf.

Zum mikrochemischen Nachweis der Volutine werden die Reaktionen von A. Meyer benutzt (zusammengestellt in der Bot. Ztg., 1904, S. 116f.). Charakteristisch ist die Reaktion mit Methylenblau-Schwefelsäure. Die Präparate kommen unter Deckglas in Methylenblau (1 Vol. gesättigte Methylenblaulösung Ehrlich [von Grübler] + 10 Vol. Wasser). Bei intensiver Färbung tritt neben Färbung auch Quellung der Volutinmassen ein. Nach einiger Zeit wird die Farblösung abgesaugt und seitlich 1proz. Schwefelsäure (1 Vol. konzentrierte Schwefelsäure + 99 Vol. Wasser) zugesetzt. Dadurch wird alles entfärbt bis auf die Volutinkörner. Sollten bei 1proz. Schwefelsäure die Zellkerne oder die Nukleolen noch schwache hellblaue Färbung zeigen, dann empfiehlt sich eine Nachbehandlung mit 5proz. Schwefelsäure. Gerbstoffe lassen sich vor der Reaktion mit Alkohol entfernen, wodurch zugleich das Material fixiert wird. Das Material kann auch durch 10 Minuten langes Behandeln mit 40proz. Formaldehydlösung fixiert werden. Die Reaktion mit Methylenblau-Jodjodkalium-Natriumkarbonat besteht darin, daß man nach dem Absaugen der Methylenblaulösung Jodjodkalium zufügt. Der Protoplast wird gelbbraun, Volutin schwärzlich. Zusatz von 5proz. Natriumkarbonatlösung bringt die Schwarzfärbung nur sehr langsam zum Verblassen. In mit Karbolfuchsin kräftig gefärbten Präparaten entfärbt 1proz. Schwefelsäure Cytoplasma und Zellkern, während die Volutinmassen fast schwarz hervortreten.

[1]) W. Henneberg, Über das Volutin oder die metachromatischen Körperchen in der Hefezelle, Wochenschr. f. Brauerei, 1915, S. 301. Vgl. dazu F. Hayduck und H. Haehn, Das Problem der Zymasebildung in der Hefe, 1. Mitt., Biochem. Zeitschr., 1922, CXXVIII, S. 568.

Henneberg fixiert mit Formalin, färbt 3—5 Minuten mit Methylenblau (0,1 g + 2,5 g Weingeist + 7,5 g Wasser) und wäscht mit 1proz. Schwefelsäure. Die Anwendung von Methylenblau zur Vitalfärbung (Volutintropfen rot, Vakuolen rosa, violett bis blau) ist nicht immer von Erfolg.

Die verschiedene Resistenz, die Kerne und Volutine nach Färbung mit Methylenblau gegen das Entfärben mit 1proz. Schwefelsäure aufweisen sollen, tritt nach Luska bei einem und demselben Objekt auf, besitzt also für die Unterscheidung von Kern und Volutin keine Beweiskraft.

Nach Zettnow[1]) behält Volutin nach Färbung mit Methylenblau seine blaue, bei Färbung mit polychromem Methylenblau die rosarote Färbung bei Behandlung mit 1proz. Schwefelsäure, während der Kern sich augenblicklich entfärbt; legt man ein mit Formalin fixiertes Präparat in ein Gemisch von 2 Vol. 1proz. Schwefelsäure und 1 Vol. polychromem Methylenblau, so nimmt Volutin die Färbung an: „Während die größeren Tropfen hell- bis schwarzrot erscheinen, zeigt die Vakuole häufig einen schön rosaroten Ton durch das in ihr in submikroskopischer Form enthaltene Volutin; das Plasma kontrastiert in himmelblauen Tönen."

Weiteres über Volutin s. im Kapitel „Zur Mikrochemie der Bakterien".

Die Gebilde, die Arthur Meyer als Volutinkörner beschreibt, wurden schon vor ihm (1887) von Babès in den Bakterien als „corpuscules métachromatiques" beschrieben und von Guilliermond[2]) 1901—1903 in den Hefen und höheren Ascomyceten studiert. Für das Volutin von Arthur Meyer schlägt derselbe Forscher dementsprechend die Bezeichnung Metachromatin vor. Aus ihm entstehen nach P. A. Dangeard (Bull. soc. myc. France 1916 u. Bull. soc. bot. France 1916) durch die Vitalfarbstoffe, besonders Kresolblau, die metachromatischen Körperchen. Die Metachromatinkörnchen, wie sie sich in der Hefe, der Mehrzahl der Pilze und vielen Algen finden, zeigen nach Guilliermond folgendes Verhalten: Sie fixieren die Vitalfarbstoffe und nehmen mit blauen Farbstoffen eine metachromatische Färbung an. Durch die Mehrzahl der Fixationsmittel werden sie unlöslich, aber diejenigen unter ihnen, die Osmiumsäure, Chromate oder Pikrinsäure enthalten, stören die spätere Färbung. Nach Fixierung durch

---

[1]) Zettnow, Kerne und Reservestoffe bei Hefen und verwandten Arten, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., 1920, XC, S. 183.

[2]) A. Guilliermond, Le vacuome des cellules végétales, Protoplasma. 1930, IX, S. 133, insbesondere S. 136ff.; Nouvelles recherches sur les corpuscules metachromatiques, Compt. rend. soc. biol., 1916, LXXIX, S. 1090.

Weingeist oder Formol besitzen sie eine starke Affinität zu blauen oder violetten basischen Anilinfarbstoffen und für Hämatein; sie nehmen damit eine rötliche metachromatische Färbung an. Eisenalaun färbt sie unregelmäßig, Rutheniumrot elektiv.

Enzyme

Enzyme sind katalytisch wirkende Stoffe, die durch die von ihnen ausgeübten Wirkungen nachgewiesen werden müssen. Durch Erhitzen, konzentrierte Säuren und Alkalien, zum Teil auch durch Gifte und ultraviolettes Licht werden sie je nach der Dauer der Einwirkung geschädigt oder zerstört. Enzyme sind in jeder lebenden Zelle vorhanden. Einzelne Organe und Gewebe (Scutellum, Kleberschicht der Gramineen) können besonders reich an Enzymen sein; in einzelnen Fällen scheinen sie in besonderen Zellen lokalisiert.

Ruhland[1]) fand bei mehreren Enzymen, daß sie leicht durch die lebende Plasmahaut hindurchtreten. Innerhalb der Zelle denkt er sich die Enzyme mit Plasmateilchen chemisch verbunden.

Im folgenden wird nur über das Wenige berichtet, das von mikrochemischem Interesse ist.

I. Auf Kohlenhydrate und Glykoside wirkende Enzyme

Saccharase

Zum Nachweis der „Saccharase", des Enzyms, das Saccharose in Glykose und Fruktose spaltet[2]), kann man versuchen, das Verfahren von Arthur Meyer zum Nachweis von Saccharose heranzuziehen. Man verfährt nach S. 301 bringt aber einen Teil der Schnitte in Saccharose-(Rohrzucker-)lösung und behandelt erst später (frühestens nach einer Stunde) in der von A. Meyer angegebenen Weise. Man kann auf Saccharase schließen, wenn diese so behandelten Schnitte eine stärkere Ausscheidung von Kupferoxydul zeigen, als die nicht mit Saccharose behandelten.

[1]) W. Ruhland, Zur chemischen Organisation der Zelle, Biolog. Zentralbl., 1913, XXXIII, S. 337.

[2]) Nach R. Weidenhagen gibt es keine spezifischen disaccharidspaltenden Enzyme. „Es gibt lediglich einfache Glykosidasen, deren Spezifität auf die sterische und konfigurative Anordnung des glykosidisch verknüpften Zuckers beschränkt ist." Rohrzucker wird durch *β-h-Fruktosidase* und *α-Glucosidase* gespalten (Zeitschr. angew. Chem., 1929, XLII, S. 833 und Zeitschr. Ver. deutsch. Zucker-Ind., 1929, LXXIX, Techn. Teil, S. 115). Dringt der Standpunkt von Weidenhagen durch, so sind auch die üblichen und auch hier gebrauchten Be-

Kertész[1]) benutzt eine von Ekkert (Ber. Ung. Pharmaz. Ges., 1929, V, S. 17) angegebene Reaktion auf Fruktose zum folgenden Nachweis der Saccharase. Eine Messerspitze der zu prüfenden Substanz wird in einer zunächst auf höchstens 45° erwärmten Lösung von 5 g Saccharose und einer Messerspitze KH_2PO_4 in 50 g Wasser nach Zusatz von Toluol bei 38° bis zum nächsten Tage stehen gelassen. Einige Tropfen des Reaktionsgemisches gibt man zu einem erbsengroßen Stück Ätzkali oder Ätznatron, die sich in einem Porzellantiegel befinden. Die durch Fruktose entstehende bräunlichrote Färbung tritt schon nach 3 Minuten ein, wenn größere Enzymmengen vorhanden waren.

Amylase (Diastase)

Amylase ist das Enzymgemisch, das Stärke zu Dextrinen und zu Maltose abbaut. Sie findet sich wohl in allen Organen, die Stärke führen. In den Erbsen kommt sie normalerweise im Cytoplasma außerhalb der Plastiden vor (Maige)[2]). Diastase kommt in Pollen- und Narbensekret vor (Branscheidt).

Die **Sekretionsdiastase** im Gramineensamen entsteht in der Kleberschicht. Während der Keimung entwickeln sich die Zellen dieser Schicht unter Verbrauch der in ihnen enthaltenen sehr kleinen Aleuronkörner (Kleber) zu lebenstätigen Drüsenzellen, die in das benachbarte Endosperm zur Verzuckerung der Stärke Diastase ausscheiden. Haberlandt[3]) schnitt aus keimenden Getreidekörnern mehrere Quadratmillimeter große Stücke der Fruchtschale aus. Die anhaftende Kleberschicht wird mit 1—2proz. Zuckerlösung sorgfältig abgespült und mit einer dünnen Schicht von Stärkebrei bedeckt. Nach 24 Stunden, unter feuchter Glasglocke aufbewahrt, sind die Stärkekörner korrodiert und zerbröckelt. Bei mechanischer Abtrennung der Kleberschicht wird übrigens die zur Mobilmachung der Stärke erforderliche Diastase in den Endospermzellen selbst gebildet[4]).

Um in einem Gewebe Amylase festzustellen, bestreicht man eine Glimmerplatte mit Stärkegelatine und stellt diese in Chloroform-

---

nennungen für die glykosidspaltenden Enzyme, die sich auf das Substrat beziehen, abzuändern.

[1]) Z. J. Kertész, Eine neue qualitative Saccharaseprobe, Biochem. Zeitschr., 1929, CCIX, S. 492.

[2]) M. A. Maige, Observations sur la digestion de l'amidon dans les cellules cotyledonaires de diverses legumineuses, Compt. rend. soc. biol., 1926, XCIV, S. 697.

[3]) G. Haberlandt, Die Kleberschicht des Grasendosperms als Diastase ausscheidendes Drüsengewebe, Ber. d. bot. Ges., 1890, VIII, S. 40.

[4]) W. Pfeffer, Über die Ursachen der Entleerung der Reservestoffe aus Samen, Sächs. Akad. Sitzgsber., 1893, S. 422 und: B. Hansteen, Flora, 1894, LXXIX, S. 419.

dampf auf. Man läßt das ausgeschnittene Gewebestück auf der sterilen Stärkeplatte mehrere Tage liegen[1]). Mit Jodzusatz ist nun um das Präparat eine Stärkelösungszone zu erkennen. Für den experimentellen Nachweis liegen die Bedingungen bei den Gramineen günstig, da eine mechanische Abtrennung der Kleberschicht und des Skutellums leicht durchführbar ist.

Nach Ohlsson (Zeitschr. physiol. Chem., 1930, CLXXXIX, S. 17) besteht die Malzdiastase aus Saccharogenamylase ($=\beta$-Amylase Kuhn) und Dextrinogenamylase ($=\alpha$-Amylase Kuhn). Unter den durch die Dextrinogenamylase aus Stärke gebildeten Stoffen herrschen Dextrine vor, unter den durch die Saccharogenamylase gebildeten überwiegt von Anfang an die Maltose. Das durch die Tätigkeit der Dextrinogenamylase entstehende System färbt Jod nicht mehr. Die Saccharogenamylase kann große Mengen Maltose bilden, ohne daß die Flüssigkeit die Eigenschaft verliert, sich mit Jod zu bläuen.

Wasicky[2]) empfiehlt folgendes Verfahren: Man führt einen Schnitt bis möglichst nahe an das zu untersuchende Gewebe, fixiert dann den Gegenstand in geeigneter Weise und reibt, indem man mit dem Mikroskop im auffallenden Licht kontrolliert, das Gewebe mittels sehr feinem Sand bis zu der Schicht fort, die man untersuchen will. Man führt dann mit haarscharfer dünner Rasierklinge einen Schnitt oder schabt das zu untersuchende Zellgemenge herunter. Man eröffnet die Zellen, indem man auf dem Objektträger mit feinem Sand verreibt und untersucht an zugesetzter feuchter Stärke die diastatische Wirkung. Oder man bereitet ein Mikroextrakt und arbeitet mit diesem.

Das Eindringen der Diastase in die Zellwände bei der Keimung der Samen wird durch ein verändertes Verhalten der betreffenden Wände gegenüber Farbstoffen angezeigt. Grüss[3]) bringt Gerstenkörner zur Keimung auf 2—3 Tage in feuchten Sand, teilt die Körner in der Längsfurche, bestreicht die Oberfläche mit Gummi arabikum und läßt sie lufttrocken werden. Sie sind nun gut schneidbar. Die Präparate werden auf dem Objektträger mit Kongorot versetzt. Nach dem Auswaschen des Farbstoffes erscheinen die unveränderten Wände tiefrot, die diastasehaltigen mehr oder weniger ungefärbt. Beim Endosperm des Mais verhalten sich die Wände gerade umgekehrt.

[1]) J. Grüss, Oxydasen und die Guajakr.. Ber. Deutsch. bot. Ges., 1898, XVI, S. 129.

[2]) R. Wasicky, Nachweis und Bestimmung von Fermenten in Pflanzengeweben mit Ausnahme der Bakterien, Die Methodik der Fermente, G. Thieme, Leipzig 1929, S. 1471.

[3]) J. Grüss, Diast. i. Pflanzenk., Ber. Deutsch. bot. Ges., 1895, XIII, S. 2.

Von Wiesner (Sitzgsber. Wien. Akad., 1885, XCII, 1, S. 41) wurde zum Diastasenachweis Aufkochen der Präparate mit Orcinsalzsäure empfohlen. Violettfärbung sollte Diastase anzeigen. Die Reaktion (vgl. F. Reinitzer, Zeitschr. physiol. Chem., 1887, XIV, S. 453) zeigt Kohlenhydrate an.

Das von Grüss beschriebene Verfahren, das auf die Bläuung einer Guajaktinktur abstellt, ist ein Verfahren zum Nachweis von Oxydasen, die mit Amylase vergesellschaftet sind. Von seiner Beschreibung wird deshalb abgesehen.

Cytase

Cytase ist ein Enzym, das Hemizellulosen abbaut und auflöst.

Zum Nachweis von Cytase im Kirschgummi läßt man eine Lösung farbloser, frisch ausgeflossener Gummistücke auf Hemizellulosemembranen einwirken (gefärbte Gummimassen enthalten meist keine Cytase, Grüss)[1]. „Einige Tropfen Gummilösung werden auf einem Deckgläschen von 3,5 qcm ausgebreitet, worauf man zu den Kotyledonschnitten (der Lupine, deren Verdickungsschichten hauptsächlich aus Galaktan bestehen) ein wenig Thymolpulver hinzugesetzt. Das so zubereitete Deckgläschen kittet man mit Paraffin auf einen hohlen Glasklotz, dessen Höhlung ein wenig Wasser mit Toluol oder Thymol als Antiseptikum enthält. Ist Cytase vorhanden, so kann man schon nach einigen Tagen unter dem Mikroskop an den sekundären Verdickungsschichten die charakteristischen Veränderungen wahrnehmen. Es ist nötig, die Schnitte in der Gummimasse von Zeit zu Zeit zu verschieben." Die Reaktion erfolgt bei der Lupine nach einigen Tagen, bei Holzmembranen erst später (innerhalb einiger Monate).

Ebenso geht man vor, wenn man Cytase in anderem Material nachweisen will.

Anthraglykosidase

Das Auftreten von Aglykonen nach dem Verfahren von Wasicky (s. S. 576, 2) weist auf die Gegenwart eines Anthraglykoside spaltenden Enzymes hin.

Rhamnodiastase, Rhamnase

Ein Xanthorhamnin spaltendes Enzym findet sich nach Grès (a. a. O. S. 574, 1) in der Samenschale von Rhamnus infectoria. Es ist vielleicht identisch mit einer Rhamnase von Ward und Dunlop (Ann. of Botany, 1887, S. 1), die in der Raphe lokalisiert ist.

Indimulsin

Die Entstehung von Indigo in dem Verfahren von Molisch (s. S. 631) weist gleichzeitig auf das Vorhandensein von Indimulsin hin.

---

[1]) J. Grüss, Über das Verhalten von Cytase und Cytokoagulase bei der Gummibildung, Jahrb. f. wiss. Bot., 1910, XLVII, S. 391.

Emulsin

Unter Emulsin sei hier das Enzym verstanden, das 1 Mol. Amygdalin in Benzaldehyd, Blausäure und zwei Moleküle Glykose spaltet.

Mikrochemische Angaben liegen darüber für die bittern Mandeln und die Kirschlorbeerblätter vor. Emulsin ist im Pflanzenreich weit verbreitet. Die Abspaltung der zwei Moleküle Glykose erfolgt nach Weidenhagen (Zeitschr. Ver. Deutsch. Zuckerind., LXXIX, Technischer Teil, S. 591) entgegen den bisherigen Anschauungen durch dasselbe Enzym, die β-Glykosidase.

Das Emulsin soll nach den älteren Angaben im Gewebe von dem zu spaltenden Glykosid getrennt in bestimmten Zellen (Enzymzellen) lokalisiert[1]) sein. Die Enzymzellen sollen durch ihren lichtbrechenden und dichten Inhalt auffallen und das Emulsin mit dem Plasma Eiweiß gemengt führen, doch gibt Spatzier an, daß im Samen der Amygdalaceen kleine Emulsinkörner vorkommen, die wie einschlußfreie Aleuronkörner aussehen und stark lichtbrechend sind. Die mikrochemischen Reaktionen der älteren Autoren sind unsicher und nur Gruppen- und Eiweißreaktionen. Guignard[2]) gebrauchte Kupfersulfat-Kalilauge (S. 669), (der Inhalt der Enzymzellen wird rotviolett, das übrige Gewebe kaum oder doch nur schwach rötlich), sowie Millons Reagens, welches beim Erwärmen tief orangerot färbt, während das benachbarte Gewebe nur schwach rosarot erscheint (Eiweiß); die Enzymzellen geben ferner die Guajakreaktion (Spatzier).

Ebensowenig besagt die Reaktion mit Orcinsalzsäure (Guignard, die jetzt im Handel befindlichen Emulsinpräparate geben keine Reaktion), bei der erwärmt werden muß, und die mit Vanillinsalzsäure, die auch ohne Erwärmung eine violettblaue Färbung gibt. Jodjodkalium ruft in den als Enzymzellen angesprochenen Zellen Bildung dunkelbrauner Ballen hervor, die fast das ganze Zellumen ausfüllen (Prunus laurocerasus), während das Nachbargewebe nur auf Stärke reagiert. Man kann auch Vanillinsalzsäure mit Jodjodkalium vereinigen (Tunmann).

Wie man sieht, sind die angeführten Reagentien nicht beweisend, sie sprechen nur für einen Eiweißgehalt bestimmter Zellen. Guignard hält diese Zellen für Enzymzellen. Nach ihm soll das Emulsin in der Mandel nur im Pericykel der Procambialstränge und im Blatte von Prunus laurocerasus in den Nerven in einer die Bündel umgebenden großzelligen Scheide lokalisiert sein (während die Glykoside nur im

---

[1]) W. Johannsen, Sur la localisation de l'émulsine dans les amandes, Ann. d. sc. nat. Bot., 1887, 7. sér. VI, S. 118.

[2]) L. Guignard, Sur la localisation dans les plantes des principes, qui fournissent l'acide cyanhydrique, Compt. rend., 1890, CX, S. 477, ferner: L. Lutz, Bull. soc. bot., 1897, XLIV, S. 26.

Blattmesophyll und Parenchym auftreten). Bei wiederholten Reaktionen hat Tunmann bei Amygdalus in der Mehrzahl die in Fig. 153 angegebene Lokalisation erhalten, in einigen Fällen blieben die Reaktionen aber im Pericykel völlig aus. Bei Pr. laurocerasus traten die Reaktionen stets in der Bündelscheide ein, wie Guignard angibt, doch außerdem in zerstreut liegenden Nervenparenchymzellen und in zahlreichen, oft sogar in allen Zellen des Schwammparenchyms.

Guignard greift zum Beweise, daß nur die Zellen der Scheide Emulsin führen, zum Experiment, trennt die emulsinhaltigen Gewebe von den seiner Ansicht nach enzymfreien. Erwärmt man Schnitte durch die Lamina (Pr. laurocerasus), die keine Bündel enthalten, auf dem Objektträger in etwas Wasser, so soll kein Geruch wahrnehmbar sein, fügt man zu dem Objekte einige Schnitte durch den Hauptnerven hinzu und erwärmt nochmals, so soll sofort ein Geruch nach Blausäure auftreten. Nun hat Tunmann von Amygdalus (amar.) nach Entfernung der Samenschale sorgfältige zarte Oberflächenschnitte gemacht, die, da sie bündelfrei sind, kein Emulsin enthalten sollen. Beim Erwärmen der Schnitte auf dem Objektträger war aber stets ein Blausäuregeruch wahrnehmbar! Die Lokalisation des Emulsins entspricht somit nach diesen Versuchen nicht den Angaben Guignards.

Fig. 153. Prunus amygdalus (Same, Keimblatt), Querschnitt mit Millon. Die sog. Enzymzellen sind schraffiert. *ie* = obere (innere) Epidermis (Tunmann)

Eine weitere Widerlegung fanden die älteren Angaben, insbesondere die von Guignard, durch Rosenthaler und Seiler[1]), die sich folgenden Verfahrens bedienten: Die Schnitte werden auf dem Objektträger mit einer dicken Aufschwemmung von Reisstärkekörnern versetzt, die mit ein wenig Jod schwach gebläut sind. Dann wird ein Tropfen einer 1proz. Lösung von Amygdalin in 50proz. Glyzerin hinzugefügt. Man legt das Deckglas auf und mischt, indem man es rasch wiederholt abhebt und auflegt. Danach ist das Präparat vor jeder Änderung zu schützen, die eine Flüssigkeitsbewegung verursachen kann. Die Gegenwart von Emulsin wird daran erkannt, daß die Stärkekörner über eine rote Zwischenstufe entfärbt werden.

Mit diesem Verfahren wurde Emulsin gefunden:

---

[1]) L. Rosenthaler und K. Seiler, Über die Lokalisation der Blausäureglykoside und des Emulsins in bittern Mandeln und Kirschlorbeerblättern, Ber. deutsch. pharmaz. Ges., 1922, XXXII, S. 245.

In den bittern Mandeln: In allen Geweben mit Ausnahme der Samenschale. Die Gefäßbündel enthalten eher weniger oder höchstens ebensoviel als das Parenchym. Auch Radicula und Plumula enthalten Emulsin.

In Kirschlorbeerblättern (Anfang März): In Palisaden und Schwammparenchym, am meisten in den Sammelzellen, nicht in den Oxalatzellen. Im Mittelnerven nur in einigen chlorophyllführenden Zellen.

Blausäureglykoside und Emulsin kommen im wesentlichen in denselben Zellen vor.

Primverase

Primverase ist ein Enzym, das Primveroside in Primverose (ein Disaccharid aus Glykose und Xylose) und das Aglykon spaltet[1]).

In Primula officinalis hat Goris die Lokalisation der Primverase zu ermitteln versucht. „Die Schnitte werden auf ein Uhrglas gebracht und dort mit einigen Tropfen Millonscher Lösung übergossen. Man erwärmt dann gelinde und nimmt die Präparate aus der Flüssigkeit heraus, sobald sie sich gleichmäßig rosa gefärbt haben. Zum Schluß legt man sie in Glyzerin." Die Enzymzellen führen gleichzeitig Gerbstoffe; sie reagieren mit „Kaliumdichromat, mit $^1/_5$ Ferrosulfat oder sehr verdünnter Ferrichloridlösung bzw. 1proz. Kupferazetatlösung." Auch nach mehrwöchentlicher Behandlung mit Weingeist (zur Entfernung der Gerbstoffe) färben sich die Enzymzellen mit Millon ziegelrot. Eine Freipräparation der Enzymzellen gelingt wegen der geringen Größe der Elemente vielleicht allein mit dem Mikromanipulator.

Fig. 154. Primula off. (Kelchblatt, Querschnitt), die sog. Enzymzellen sind schwarz eingezeichnet (nach A. Goris)

Die Enzymzellen finden sich in allen Teilen der Pflanze: in der Wurzel im Zentralzylinder, nicht im Rindenparenchym (damit stimmt überein, daß man die Wurzel zur Entwicklung des charakteristischen Geruches [zur Spaltung der Glykoside] zerquetschen muß, „ein einfaches Zerreiben genügt nicht"), im Blatt und Blattstiel, Blütenschaft und Blüten-

[1]) Goris et Ducher, Sur le mode de production de l'essence dans les racines de Primula officinalis Jacq., Bull. sc. pharm., 1906, XIII, S. 536.

stiel „vorwiegend in der Umgebung der Bast-, Holz-, Gefäßbündel", in Kelch- und Blumenblättern außerdem noch in der Epidermis (Fig. 154).

Da Millons Reagens (vgl. S. 665) ein Reagens auf Eiweiß ist, so bedürfen die Angaben von Goris einer Nachprüfung mit anderen Verfahren.

Myrosin

Unter Myrosin versteht man das Enzymgemisch aus α-Thioglucosidase und Sulfatase, das Senfölglykoside spaltet[1]).

Myrosin kommt in besonderen Zellen vor. Die Verteilung dieser Idioblasten im Gewebe benutzte Schweidler[2]) zur Einteilung der Cruciferen. Man unterscheidet: 1. Exo-Idioblasten, im Mesophyll lokalisiert, chlorophyllführend. Die Chlorophyllkörner sind aber klein und nicht intensiv gefärbt, daher in dem stark lichtbrechenden Inhalt leicht zu übersehen. 2. Endo-Idioblasten, chlorophyllfrei, meist prosenchymatisch, die Leitbündel begleitend. 3. Hetero-Idioblasten, Pflanzen mit Mesophyll- und Leitbündel-Idioblasten. Die Myrosine sind nicht auf die Cruciferen beschränkt; wahrscheinlich finden sie sich überall dort, wo Senfölglykoside vorkommen. Wir hätten Myrosine nicht nur in Capparidaceen, Cruciferen, Resedaceen, Tropaeolaceen, Limnanthaceen, sondern auch in Carica Papaya und Moringa (Guignard), im Violasamen (Spatzier), in Leguminosensamen (Bokorny), in der Rinde von Scorodophloeus Zenkeri (Leguminosen, Hartwich), in Umbelliferenwurzeln, Zwiebeln von Alliumarten und nach Muschler in Coronopus-Arten, C. niloticus (Leptom der Wurzeln), C. integrifolius (primäre Wurzelrinde), C. verrucarius (Pericykel der Zweige).

Die Myrosinzellen sind chlorophyllfrei oder doch arm an Chlorophyll, in Wurzeln stärkefrei oder doch stärkearm; in Gestalt und Größe sind sie teils von den benachbarten Zellen nicht zu unterscheiden, teils treten sie als langgestreckte (Eiweißschläuche) oder sternartige Elemente auf (Schwammparenchym der Blätter). Im Stengel sind sie im Pericykel, doch auch in primärer Rinde und sekundärem Phloem, im Blatte im Schwammparenchym, Nervenparenchym, seltener im Palisadengewebe, in der Wurzel in der Rinde (Hypodermis und Pericykel), in Knollenwurzeln auch im Xylem und Phloem, im Samen in Radicula und Kotyledonen. Nach Guignard ist die Verteilung in den vegetativen Teilen und im Samen eine analoge. Wo sie in Rinde und Mark des Stengels und im Blattparenchym auftreten, finden sie sich auch im Parenchym der Kotyledonen und der Radicula. Meist sind Enzym und Glykosid im Embryo enthalten. Bei Lunaria, Matthiola u. a. ist das Enzym fast nur in der Samenschale, das Glykosid im Embryo.

[1]) H. v. Euler und S. E. Erikson, Zur Kenntnis der enzymatischen Spaltung des Sinigrins, Fermentforschung, 1926, VIII, S. 518.

[2]) J. H. Schweidler, Die systematische Bedeutung der Eiweiß- oder Myrosinzellen der Cruciferen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 274.

An lebend mit absolutem Alkohol fixiertem Material fallen an dünnen Präparaten die Myrosinzellen durch ihren geronnenen Inhalt auf, an Herbarmaterial als homogene, farblose, frei im Zellumen liegende Klumpen oder die Zelle ausfüllende Massen, an Samen als kleinkörnige Gebilde. Im allgemeinen kann man sagen, daß das Myrosin in den vegetativen Teilen der Pflanze meist in gelöster Form als wasserhelle Substanz auftritt. Das gelöste Myrosin koaguliert in warmem Wasser (60°) schon nach wenigen Minuten; Weingeist und verdünnte Säuren bringen es zum Gerinnen. Konzentrierte Schwefelsäure färbt bei gelindem Erwärmen purpurrot. Spatzier gibt noch zwei weitere Reaktionen an. Eine verdünnte Lösung von p-Diazobenzolsulfosäure (frisch bereitet durch Eingießen eines Gemisches von sulfanilsaurem Natron und Kaliumnitrit in verdünnte Schwefelsäure) färbt orangegelb. Eine Lösung von Indigo in Schwefelsäure, die durch sehr wenig Salpetersäure in Isatin übergeführt ist, färbt braunrot. Pepsinsalzsäure löst, aber erst nach längerer Zeit. In den Samen findet sich das Enzym in Gestalt kleiner, farbloser, stark lichtbrechender Körnchen, welche kleinen einschlußfreien Aleuronkörnern ähnlich sind und sich weder in Weingeist, Äther, Öl, noch (im Gegensatz zu den Aleuronkörnern) in verdünnter Essigsäure lösen. Sie lösen sich aber sehr leicht in Wasser.

Um sich über die Verteilung der Myrosinzellen zu unterrichten, benutzt man bei Zweigen und Wurzeln tangentiale Längsschnitte, bei Blättern Flächenschnitte. Dünnere Blätter lassen sich auch in toto verwenden, wenn man frisches Material durch längeres Einlegen in absoluten Alkohol entfärbt (und fixiert) hat und mit Millons Reagens prüft. Schweidler[1]) fixierte Arabis mit Alkohol und färbte mit Säurefuchsin und Kernschwarz.

Gute Erfolge gibt Millons Reagens[2]). Die Schnitte werden direkt in das Reagens eingetragen und gelinde erwärmt. Schnitte aus Alkoholmaterial, die vorzuziehen sind, werden zuvor mit stark verdünnter Salpetersäure (1 : 100) befeuchtet. Der Inhalt der Myrosin-

[1]) J. H. Schweidler, Die Eiweiß- oder Myrosinzellen der Gattung Arabis L., Beih. Bot. Zentralbl., 1910, XXVI, S. 422. — W. Spatzier, Über das Auftreten und die physiologische Bedeutung des Myrosins in der Pflanze, Jahrb. f. wiss. Bot., 1903, XXV, S. 71.

[2]) E. Heinricher, Eiweißschläuche d. Cruciferen und verwandte Elemente in der Rhoeadineenreihe, Mitt. Grazer bot. Inst., 1886. — W. Spatzier, Auftreten u. d. physiol. Bedeut. d. Myrosins in der Pflanze, Jahrb. f. wiss. Bot., 1893, XXV, S. 56. — C. Hartwich u. A. Vuillemin, Beitr. z. Kenntn. d. Senfsamen, Apoth.-Ztg., 1905, XVIII, Sep. S. 22. — R. Muschler, Monogr. d. Gatt. Coronopus, Englers bot. Jahrb., 1908, XLI, S. 112.

zellen wird schnell orange, dann körnig leuchtend rot. Die Rotfärbung hebt sich scharf von dem Hellrot oder Rosa der benachbarten Zellen (Eiweißreaktion) ab. Bei Samen (Brassica) wird man die Präparate zuvor mit Äther oder Chloroform entfetten und die Aleuronkörner eventuell mit verdünnter Essigsäure entfernen. Zu beachten ist schließlich, daß bei Objekten, die Sinalbin führen, dieses gleichfalls in Reaktion tritt und Rotfärbung gibt (Hartwich). In solchen Fällen (Samen von Sinapis alba) muß das Glykosid entfernt werden. Die Entfernung gelingt nur zum Teil durch Behandeln der Präparate mit kochendem Weingeist. Schnitte, die monatelang in absolutem Alkohol gelegen haben, vertragen ein kurzes Auswaschen mit Wasser, ohne daß das koagulierte Myrosin in Lösung geht.

Als Hilfsreaktion läßt sich konz. Salzsäure anwenden. Guignard[1]) wollte die Salzsäurereaktion verbessern und gebrauchte Orcinsalzsäure (1 ccm Salzsäure + 1 Tropfen 10% wässerige Orcinlösung) und Spatzier Orceinsalzsäure. Eine Lösung von gereinigtem Myrosin gibt mit Orcinsalzsäure aber keine Reaktion. Die Reaktion (Rotfärbung) wird ausschließlich durch die Salzsäure allein bedingt. Sie tritt beim Erwärmen sofort ein, in der Kälte erst nach einiger Zeit, ist aber dann besser lokalisiert. Bei mit Stärke erfüllten Winterwurzeln des Meerrettichs hat Tunmann mit Salzsäure (mit und ohne Orcinzusatz) keine Reaktion erhalten. Weitere Hilfsreaktionen sind (Spatzier): Jodreagentien (Jodwasser, Chlorzinkjod, Jodchloral, goldgelbe Färbungen), Cochenilletinktur (violett), Naphthylenblau (blauviolett), Kalilauge (goldgelb).

Myrosinreiche Präparate zeichnen sich in vielen Fällen durch ihren Gehalt an Phosphorsäure aus (Dentaria, s. S. 151, auch in Cochlearia armoracia). — Über die Lokalisation des Myrosins in Moringa hat F. Jadin Angaben gemacht (Compt. rend., Apoth.-Ztg., 1900, XV, S. 771).

Peche[2]) legte Schnitte durch die Rinde von weißem oder besser schwarzem Rettich in eine 10proz. Kaliummyronatlösung, die mit Barium-, Strontium- oder Kalziumchlorid gesättigt ist. Bei Anwendung von Bariumchlorid sieht man nach kurzer Zeit den Inhalt einzelner, aber nicht aller Eiweißschläuche mit weißen Kügelchen bedeckt, die offenbar aus Bariumsulfat bestehen; bei Verwendung von Strontiumchlorid wird der Niederschlag grobkörniger, von mehr oder minder großen Kugeln durchsetzt. Mit Kalziumchlorid bilden sich erst allmählich innerhalb und außerhalb der Schnitte Gipsnadeln (es ist also zur Ermittlung der Lokalisation unbrauchbar).

Die Verteilung der Myrosinzellen ist sowohl bei der Osmiumsäure- als der Permanganatreaktion zu sehen (s. S. 655); bei jener färben

[1]) L. Guignard, Sur la localisation des principes, qui fournissent les essences sulfurées des Crucifères, Compt. rend., 1890, CXI, S. 920.

[2]) K. Peche, Mikrochemischer Nachweis des Myrosins, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1913, XXXI, S. 458.

sich die Myrosinzellen graubraun, bei dieser hellgelb, indem die Spaltungsprodukte des Sinigrins, soweit sie nicht schon vorhanden sind, in die Zellen hineindiffundieren (Peche).

II. Esterspaltendes Enzym (Esterase)

Chlorophyllase

Chlorophyllase spaltet die Chlorophylle in Phytol und eine Säure und verestert letztere mit Äthylalkohol zu Äthylchlorophyllid, mit Methanol zu der entsprechenden Methylverbindung (Willstätter und Stoll).

Zum Nachweis bringt man Schnitte auf einem Objektträger in einen großen Tropfen 30—50proz. Äthylalkohol. Sind genügend Chlorophyll und Chlorophyllase vorhanden, so entstehen zum Teil innerhalb, zum Teil außerhalb der Zelle die charakteristischen drei- und sechseckigen Kristalle des Äthylchlorophyllids[1]). Größere Mengen organischer Säuren stören.

S. a. H. Meyer, Untersuchungen über die Chlorophyllase, Planta 1930, XI, 294.

III. Enzyme, welche Sauerstoff abspalten oder übertragen

Oxydasen

Oxydasen sind Enzyme, die molekularen Sauerstoff übertragen. Man unterscheidet die Oxydasen nach dem Substrat, auf das sie ihre Wirkung ausüben, als Phenoloxydasen, Aminoxydasen usw. Die Oxalase oxydiert Oxalsäure und Oxalate.

„Wenn in Extrakten einer Zellart viele verschiedene Oxydasen gefunden werden, so sind dies nicht Fermente, die in der lebenden Zelle schon vorhanden waren, sondern Umwandlungs- und Zerfallsprodukte einer im Leben einheitlichen Substanz" (Warburg)[2]).

Ein aus Erbsen und Hefe durch Wasserdialyse nach Hansteen-Cranner dargestelltes wasserlösliches Phosphatid gibt die Nadi-(Oxydase)-Reaktion in einer Menge von 0,04 mg. Die Wirkung wird durch Erhitzen nicht zerstört und ist spezifisch[3]).

[1]) J. Borodin, Über Chlorophyllkrystalle, Bot. Ztg., 1882, XL, S. 608. — E. Liebaldt, Über die Wirkungen wässeriger Lösungen oberflächenaktiver Substanzen auf die Chlorophyllkörner, Zeitschr. f. Bot., 1913, V, S. 65.

[2]) O. Warburg, Atmungsferment und Oxydasen, Biochem. Zeitschr., 1929, CCXIV, S. 1.

[3]) M. Gutstein, Wasserlösliches Phosphatid und Oxydase-(Nadi)-Reaktion, Biochem. Zeitschr., 1929, CCVII, S. 177.

Über ein in Pflanzen vorkommendes oxydierendes Enzym (Metaoxydase) s. J. Boas, Biochem. Ztschr., 1930, CCXXVII, S. 135.

Oxydasen sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Sie sind sehr häufig in den Vakuolen zu finden (Mangenot)[1].

Oxydasen (und Peroxydasen) finden sich in den Kalabarbohnen hauptsächlich in dem inneren Teil der Samenschale und in geringerer Menge in den äußeren Teilen der Kotyledonen und außerdem in den Gefäßbündeln[2].

Zum Nachweis oxydierender Fermente in der lebenden Zelle stellte E. Küster[3]) Sproßspitzen und Zwiebeln in Lösungen von Benzidin (0,01 und 0,02 %), Pyrogallol (0,01—0,1 %) und Dimethyl-paraphenylendiamin (0,1 und 0,5 %) mit oder ohne Zusatz von α-Naphthol. Die besten Resultate erhielt er mit Pyrogallol. Ließ er zu Schnitten der Triebspitzen von Solanum Lycopersium, die 4 Tage mit der Schnittfläche in die Pyrogallollösung tauchten, vom Rand des Deckglases aus H_2O_2 zufließen, so färbte sich der kontrahierte Protoplast violett, ohne das Aussehen eines lebenden Protoplasten zu verlieren.

Das älteste der zum Nachweis von (Phenol-)Oxydasen angewandten Reagentien ist Guajaktinktur. Man bringt die Schnitte in einen 10proz. frisch bereiteten weingeistigen Auszug von Guajakspänen (weniger gut von Guajakharz). Die oxydasehaltigen Gewebe färben sich blau.

Zum Nachweis von Oxydase benutzt Czapek[4]) α-Naphthol und Paraphenylendiamin in alkalischer Lösung. Man verwendet nach Vernon (Biochem. Ztschr. 1912, XLVII, S. 374) eine 1proz. Lösung von α-Naphthol in 50proz. Weingeist, eine 0,75proz. wässerige Lösung des Amins und eine 1,7proz. wässerige Sodalösung. Man mischt je 1 ccm der Lösungen und verdünnt mit 10 ccm Wasser. Oxydasehaltige Zellen und Gewebe färben sich damit rasch blau. Blaue Fällungen entstehen, wenn man die Präparate auf 2 Minuten in eine 1proz. schwach alkalische Lösung von α-Naphthol bringt und dann auf 2 Minuten in eine 1proz. Lösung von Dimethylparaphenylendiamin. Auch Tetramethylparaphenylendiaminchlorid (in verdünnter wässeriger Lösung) wird empfohlen und als günstiges Versuchsobjekt von Parasiten (Mistel)

[1]) G. Mangenot, Sur la localisation cytologique des peroxydases et des oxydases, Compt. rend. acad. sciences, Paris 1928, CLXXXVI, S. 714.

[2]) Morvillez et Polonovski, Localisation des ferments et processus diastasiques dans la fève de Calabar, Compt. rend. soc. Biolog., 1921, LXXIII, S. 183.

[3]) E. Küster, Über den Nachweis oxydierender Fermente (über Vitalfärbung der Pflanzenzellen VI), Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1927, XLIV, S. 31.

[4]) Fr. Czapek, Stoffwechselprozesse in der geotropisch gereizten Wurzel, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1902, XX, S. 405.

befallene Pflanzenteile. Die Schnittfläche wird mit der Lösung bestrichen. Das Holz wird schwach, die Rinde stark violett gefärbt. Die Färbung der Rinde geht, falls Gerbstoffe zugegen sind, in Blau über.

Das alkalische Gemisch von α-Naphthol und Dimethyl-p-phenylendiaminhydrochlorid wird der Kürze halber — nach den Anfangsbuchstaben der Komponenten — als Nadi bezeichnet, so von Graeff[1]), der ein Gemisch äquimolekularer Mengen einer 1,0 proz. wässerigen Lösung von α-Naphthol und einer 1,2 proz. Lösung der Base verwenden läßt, d. h. gleiche Volumina von jeder Lösung. Das Optimum der Reaktion liegt bei pH = 3,0—6,0.

Vgl. dazu D. C. Harrison, Die Indophenolreaktion bei biologischen Oxydationen, Biochem. Journ., 1929, XXIII, S. 982; Chem. Zentralbl., 1930, I, S. 3315.

Zum Nachweis von Oxydasen bei holzzerstörenden Pilzen benutzt Bavendamm[2]) Tannin und Gallussäure in festen Nährböden.

Sehr häufig wird auch zum Nachweis von Oxydasen Benzidin[3]) in Weingeist oder Eisessig gelöst) angewandt, das durch Oxydasen in blaue oder blaugrüne Stoffe übergeht. Seine Anwendung kann analog der des Guajaks erfolgen.

Die Benzidinprobe wurde mit Algen noch in folgender Weise ausgeführt: Auf den Objektträger wurde eine weingeistige Benzidinlösung gegossen und auf die nach Verdunsten des Weingeists verbleibenden Kristalle eine dünne Schicht der in der Reibschale zerquetschten Algenmasse gebracht. Nach dem Eintrocknen wurde die Masse mit einem Tropfen destillierten Wassers betupft und nach Bedecken mit einem Deckglas untersucht. Bei Vorhandensein oxydaseführender Zellen sind teils blaue Niederschläge, teils blaugefärbte Kristalle, teils Blaufärbung des Inhalts einzelner Zellen zu beobachten. Bei größeren Mengen von Oxydase können in letzterem blaue Kristalle auftreten.

Im einfachsten Fall kann man intakte, besonders oxydasenreiche Algen auf Benzidinpapier pressen und eintrocknen lassen.

Interzellulare Oxydasen wies Raciborski[4]) z. B. in Nymphaea-Arten dadurch nach, daß er sehr verdünnte Lösungen von Benzidin und α-Naphthylamin durch die lebende Pflanze aufnehmen ließ (eventuell Aussalzen in Schnitten mit gesättigter Ammonsulfatlösung.)

---

[1]) S. Graeff, Intrazelluläre Oxydation und Nadireaktion (Indophenolblausynthese), Zieglers Beitr. pathol. Anat., 1922, LXX, S. 1 nach Bot. Zentralbl. 1926, N. F., IX, S. 188.

[2]) W. Bavendamm, Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstörenden Pilzen, Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz, 1928, XXXVIII, S. 257.

[3]) O. Gertz, Über die Oxydasen der Algen, Biochem. Zeitschr., 1926, CLXIX, S. 435.

[4]) M. Raciborski, Bull. de l'Acad. des sciences de Cracovie Math. nat. Kl., 1905, S. 668.

Schnitte durch das hypokotyle Glied bestimmter Phaseolus vulgaris-Varietäten, deren Keimlinge in einer schwachen Benzidinlösung kultiviert wurden, zeigen rote oder violette Punkte, die den Gerbstoffzellen entsprechen. Die Färbung tritt in den Pektinhüllen von deren Inhalt auf; dieser selbst sowie die Zellulosemembranen bleiben farblos (daneben tritt die rotbraune Färbung der Mangin-Raciborskischen Reaktion in den verholzten Membranen auf). Die Reaktion ist auf die Gegenwart einer Oxydase in den Pektinhüllen zurückzuführen (Rouppert)[1].

Einen Überblick über die Verteilung der Oxydasen erhält man mit dem Wursterschen Tetrapapier[2]). Legt man auf einen Streifen des Papiers frische Schnittflächen von Organen, so erzeugen die oxydasehaltigen Stellen eine Blaufärbung.

Begemann[3]) benutzt zum Nachweis der Lokalisation der Oxydase (und Peroxydase) nach Chodat eine 1proz. Pyrogallollösung und Zugabe von 1 % Glykose, die das Eindringen des Pyrogallols in die Zelle erleichtern soll. Er taucht ein Stückchen Wurzel eines Pelargoniumkeimlings in die Lösung und läßt eintrocknen. Er fand, daß die entstandenen Purpurogallin-Kristalle meist den Zellwänden anliegen. An den Haaren waren nie Kristalle vorhanden.

Tyrosinase

Tyrosinase ist das Enzym, das Tyrosin in Melanin, einen dunkelfarbigen Stoff, umwandelt; es wirkt auch auf tyrosinhaltige Polypeptide, Suprarenin und andere aromatische Phenolgruppen besitzende Stoffe.

Über die Verbreitung der Tyrosinase siehe C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. In den Keimpflanzen von Lupinus albus ist sein Sitz besonders an der Grenze von Hypokotyl und Wurzel und im obersten Teil der Wurzel (Bertel, Ber. Deutsch, bot. Ges., 1902, XX, S. 454).

Als Reagens auf Tyrosinase kann man außer Tyrosin auch das Dopa-Reagens (3,4-Dioxyphenylalanin) heranziehen; es tritt gelbbraune oder schwarze Färbung ein.

Jodidoxydase

Als ein besonderes Enzym wird die Jodidoxydase[4]) betrachtet, die aus Kaliumjodid Jod freimacht. Die mit der Jodidoxydation erhaltenen

[1]) C. Rouppert, Sur la benzidine comme réactif dans les plantes vivantes, Compt. rend. Acad. sciences, Paris 1926, CLXXXII, S. 533.

[2]) Papier, das mit Tetramethyl-p-phenylendiamin getränkt ist.

[3]) O. H. K. Begemann, Beiträge zur Kenntnis pflanzlicher Oxydationsfermente, Pflügers Arch., 1915, CLXI, S. 45; Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1916, XXXIII, S. 305; Diss. Bern, 1914/15.

[4]) Die erste Beobachtung, daß der Saft einiger höherer Pflanzen aus Alkali-

Ergebnisse stimmen im allgemeinen mit den durch Guajak oder Benzidin erhaltenen überein, ausgenommen bei den höheren Pilzen, wo bei negativer Guajakreaktion positive Jodidreaktion eintreten kann.

Gertz fand Jodidoxydasen in den Rhodophyceen-Gattungen Rhodomela, Polysiphonia, Delesseria, Ondonthalia, Brongniartella und Furcellaria, während sie bei Ceramium, Cystoclonium, Rhodymenia und Nemalion fehlen[1]).

Nicht identisch mit der Gertzschen Jodidoxydase ist ein von Lunde und Cloß (Nature, CXXIV, S. 578) isolierter hitzebeständiger Stoff, der bei saurer Reaktion aus der Laminaria-Jodverbindung und aus Kaliumjodid Jod freimacht.

Kylin fand Jodidoxydasen bei der Cyanophycee Calothrix scopularum.

Reich an Jodidoxydasen sind nach Kylin folgende Rhodophyceen: Furcellaria fastigiata, Delesseria sanguinea, Polysiphonia violacea, P. fibrilosa, P. elongata, P. Brodiaei, P. nigrescens, Brongiartella byssoides, Pterosiphonia parasitica, Rhodomela subfusca, Rh. virgata, Odonthalia dentata.

Bei den untersuchten Rhodophyceen treten die Jodidoxydasen nicht aus den lebenden Zellen aus; die Blaufärbung der Stärke tritt erst nach dem Absterben der Thallusteile ein.

Kylin fand weiter, daß auch Laminaria digitata, L. saccharina und L. Cloustoni aus Alkalijodiden Jod abspalten, ferner Ascophyllum nodosum, Fucus vesiculosus und in geringem Grade Chorda filum. Die Jodidoxydasen werden bei den Laminaria-Arten von den Oberflächenzellen gebildet.

Nach Dangeard (Compt. rend. Acad. sciences 190, S. 131) ist zum Freimachen des Jods aus lebenden Laminarien u. a. Meeresalgen die Mitwirkung von Sauerstoff nötig. Nach demselben Autor (Le botaniste, 1930, XXII, S. 33) bedarf die Frage der Jodidoxydasen noch der weiteren Untersuchung, da Kylin die Verflüchtigung von Jod aus den lebenden Algen nicht beachtet habe.

Kylin (Zeitschr. physiol. Chemie 1930, CXCI, S. 200) gibt neuerdings an, daß die Oberflächenzellen das jodoxydierende Enzym nach außen abscheiden, so daß es dann die Außenmembran durchtränkt. Da unter gewissen Bedingungen auch die Jodide in die Außenmembran austreten, so kann an dieser freies Jod entstehen.

jodiden freies Jod abspaltet, wurde von Bach und Chodat 1902 gemacht (Ber. Deutsch. chem. Ges., 1902, XXXV, S. 2466).

[1]) O. Gertz, Über die Oxydasen der Algen. Biochem. Zeitschr., 1926, CLXIX, S. 435.

Gertz verwendet zum Nachweis der Jodidoxydasen zwei Verfahren:

1. Zum Sieden erhitzter Stärkekleister aus einer „Federmesserspitze“ Kartoffelstärke und 100 ccm Wasser wird mit 3 g Kaliumjodid und 10 g (sauer reagierender) Gelatine versetzt. Das Gemisch wird in eine Petrischale gegossen. Auf das nach Abkühlen erstarrte Substrat wird das zu prüfende Material (frisch abgeschnittene Thallusstückchen oder ausgepreßter Saft zerquetschter Algen) gebracht und das Ganze in den Eisschrank gestellt.
2. Man bringt einige Tropfen ausgepreßten Saft in einem Reagensglas zu einem mit Essigsäure angesäuerten Gemisch von flüssigem Stärkekleister und Kaliumjodidlösung.

Kylin empfiehlt bei der Prüfung auf Jodidoxydasen Versuche mit verschiedenem p_H anzusetzen und sie im Dunkeln zu belassen.

Da aus Kaliumjodid bei Gegenwart von Säuren leicht — besonders bei längerer Versuchsdauer — Jod frei wird, so sollten bei der Prüfung auf Jodidoxydasen stets Kontrollversuche ohne das Enzym angesetzt werden, am besten so, daß man Versuche unter denselben Verhältnissen wie bei den Hauptversuchen anstellt, aber pflanzliche Präparate verwendet, in denen das Enzym durch Erhitzen abgetötet ist.

Peroxydasen

Peroxydasen sind Enzyme, die den Sauerstoff von Peroxyden auf die oxydablen Stoffe übertragen.

Nach Mangenot haben die Peroxydasen ihren Sitz in den Chondriosomen oder häufiger in den Vakuolen.

Die weißen Teile panachierter Blätter sind nach Chodat reicher an Peroxydasen als die grünen.

Zum Nachweis der Peroxydasen können prinzipiell dieselben Reagentien dienen wie zum Nachweis der Oxydasen; nur muß außerdem ein Peroxyd (Wasserstoffperoxyd) hinzugesetzt werden.

Man kann auch Oxydasen und Peroxydasen nebeneinander nachweisen, indem man beispielsweise zuerst Guajaktinktur zusetzt und nach dem Verschwinden der zunächst auftretenden Blaufärbung noch Wasserstoffperoxyd.

Zum Nachweis von **Peroxydasen** in Schnitten eignet sich nach Grüss[1]) weinsaures Ursol. Eine gesättigte weingeistige Ursollösung[2]) wird einer gesättigten weingeistigen Weinsäurelösung zugefügt, der

---

[1]) J. Grüss, Abhandl. üb. Enzymwirk., Zeitschr. f. Pflanzenkrankh., 1907, XVII, S. 65.

[2]) Ursol, auch Ursol D, ist aber ein für technische Zwecke von der A.-G. für Anilinfarben, Berlin, hergestelltes Paraphenylendiamin.

weiße Niederschlag von Ursoltartrat wird gesammelt, mit Weingeist ausgewaschen, mit Äther umkristallisiert. Etwas Ursoltartrat wird in Wasser gelöst und die Lösung mit H_2O_2 versetzt. Mit diesem stets frisch zu bereitenden Reagens werden die Schnitte auf dem Objektträger behandelt. Zellen mit Peroxydasen färben sich grün, dann blau, schließlich schieferfarbig.

Leptomin hat Raciborski[1]) einen Sauerstoff übertragenden Körper genannt, der im Leptom (daher die Bezeichnung), speziell in den Siebröhren und Geleitzellen sowie in den Milchröhren der Gefäßpflanzen auftritt, in Glyzerin und Wasser löslich, in Weingeist unlöslich ist und durch kurzes Erwärmen auf 95° zerstört wird. Leptomin[2]) ist ein amorphes weißes Pulver, das von verd. Alkalien (Ammoniak, Kalkwasser) nicht angegriffen, von verd. Essigsäure oder von Pikrinsäure aber zerstört wird. Im Stengel von Saccharum zeigt Guajaklösung durch Bläuung Oxydasen im Parenchym an, die Leptomteile reagieren nicht. Befreit man den Stengelteil von Oxydasen durch Eintauchen in absoluten Alkohol oder durch Erhitzen auf 60°, so erhält man mit Guajaklösung allein keine Reaktion; Guajaklösung und wenig H_2O_2 zeigt aber durch tiefblaue Farbenreaktion in den Siebteilen das Leptomin an. Tote Pflanzen geben die Reaktion nicht mehr.

Die gleiche Beobachtung haben J. Jamieson (Respiration of Pl.. Just Jahrb. 1878, I, S. 624) an Früchten und Knollen und Grüss an stärkeren Stengelquerschnitten von Platanus, Betula, Salix, Pirus, Picea u. a. gemacht. Die Guajakreaktion tritt nicht scharf auf, auch die benachbarten leptominfreien Zellen zeigen sie mehr oder weniger. Raciborski[3]) verwendete daher außerdem α-Naphthol[4]) und H_2O_2. Die eintretende Violettfärbung genügt für mikroskopische Zwecke und hält sich in Dauerpräparaten (in Glyzerin besser als in Kanadabalsam). Wir haben es bei der Leptominreaktion jedenfalls mit einer Peroxydase zu tun.

Nach dem Vorgang von Raciborski und Unna verwendet Schneider[5]) das Benzidin zum Nachweis von Peroxydasen, indem er die Schnitte in ein Gemisch gleicher Teile von 1 proz. weingeistiger Benzidinlösung und 3 proz. Wasserstoffperoxyd legt. Die zunächst blaue Farbe geht je nach dem Enzymgehalt in braun bis schwarz über.

[1]) M. Raciborski, Ein Inhaltskörper des Leptoms, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1898, XVI, S. 52 und: Weitere Mitteilungen über das Leptomin, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1898, XVI, S. 119.

[2]) Da „Leptomin" auch außerhalb der Siebröhren vorkommt, in den Siebröhren selbst fehlen kann, so liegt eigentlich kein Grund vor, diese Bezeichnung weiterzuschleppen. Es ist eben eine Peroxydase.

[3]) M. Raciborski, Einige Demonstrationsversuche mit Leptomin, Flora, 1898, LXXXV, S. 362.

[4]) Eine 15% weingeistige Naphthollösung wird bis zur beginnenden Ausscheidung von Naphthol mit Wasser verdünnt; Einwirkung 3—10 Stunden.

[5]) H. Schneider, Über die Unnaschen Methoden zur Feststellung von Sauerstoff- und Reduktionsorten und ihre Anwendung auf pflanzliche Objekte, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1914, XXXI, S. 51.

Als zweites Reagens benutzte er Pyrogallol (Bach und Chodat). Die Schnitte werden einige Zeit mit einer Mischung gleicher Teile 10 proz. wässeriger Pyrogallollösung und 1 proz. Wasserstoffperoxyd behandelt: Gelbbraune bis orange Färbung.

Narutowicz[1]) findet eine Lösung von Benzidin in H_2O_2-haltigem Aceton reaktionsfähiger als eine weingeistige Benzidinlösung. Rongalitweiß erwies sich für Champignonuntersuchungen als unbrauchbar.

Von Grüss[2]) wurde als Hilfsmittel zum Nachweis von Oxydasen und Peroxydasen die Kapillaranalyse herangezogen. Die Methode, **Chromogramm-Methode,** wendet gleichzeitig Diffusion und Kapillarattraktion an. Benutzt wird ein ausgespanntes Filtrierpapier, das etwas angefeuchtet wird; auf die angefeuchtete Stelle bringt man einen Tropfen Zellsaft oder die zu untersuchende Substanz (Sekretmasse). Die Kapillarisation muß unter antiseptischen Bedingungen und unter Ausschaltung der Luft in einem dampfgesättigten, eventuell mit Wasserstoff angefüllten Raum vor sich gehen. Dann werden Reagentien zugefügt, die intensive Färbungen geben. Die Arbeitsweise ist aus den folgenden Beispielen ersichtlich: Man läßt einen Tropfen Zellsaft von Pteris aquilina, der schwach alkalisch gemacht wurde, in der angegebenen Weise unter Wasserstoff kapillarisieren. Nach beendeter Kapillarisation wird mit Wasser und dann mit einer sehr verdünnten Lösung von Tetramethylparaphenylendiaminchlorid angefeuchtet. An der Luft entsteht ein violettes Zentrum (Oxydase), welches von einer farblosen Zone (Antioxydase) umgeben ist, außerhalb der eine langsame Autoxydation erfolgt. Läßt man den Zellsaft an der Luft aufsaugen, so entsteht nach einiger Zeit ein rotbraunes Feld, aus dem in Essigsäuredampf eine Außenzone herausrückt; Guajaktinktur-H_2O_2 färbt auf das ganze Feld gebracht, die Außenzone blau (Peroxydase). — Ein anderer Versuch: Man läßt unter Wasserstoff einige Tropfen eines weingeistigen Auszuges aus unfermentierten Kakaobohnen kapillarisieren und läßt „etwas entfernt davon den zweimal unter Wasserstoff kapillarisierten Zellsaft aus den Parenchymzellen der Kartoffelknollen auffallen. Berühren sich beide Felder in Gegenwart von Sauerstoff, so schlägt an der Berührungsstelle der violette Farbstoff in braun um" (Oxydasewirkung). Das bei Ausschluß des Luftsauerstoffes gewonnene Kapillarisationsfeld des Kartoffelzellsaftes gibt mit Ursoltartrat-H_2O_2 in der peripheren Grenzlinie eine schieferfarbige Färbung (Peroxydasewirkung). Man kann auch nach erfolgter Kapillarisation das kreisförmige Feld in die erforderliche Anzahl Sektoren zerlegen, die dann mit den betreffenden Reagentien behandelt werden[3]).

Katalase

Katalase ist das Enzym, das Wasserstoffperoxyd in Wasser und Sauerstoff zersetzt. Sie ist im Pflanzenreich weit verbreitet.

[1]) J. Narutowicz, Untersuchungen über die Verteilung der Oxydationsfermente in der Champignonzelle nach Chem. Zentralbl., 1929, I, S. 2543.

[2]) J. Grüss, Botanische Mikrochemie, Naturf. Vers., Königsberg 1910, Verh. II_1, S. 72.

[3]) Vgl. auch J. Grüss, Kapillarisation der Fermente in Die Methodik der Fermente von Oppenheimer u. Pincussen, S. 1442.

Gegenwart von Katalase gilt als nachgewiesen, wenn auf Zusatz einer verdünnten Wasserstoffperoxydlösung sofort eine Gasentwicklung eintritt. Dabei wird vorausgesetzt oder muß, wenn nötig, noch besonders bewiesen werden, daß das Wasserstoffperoxyd nicht anderweitig, etwa durch Ferrosalze oder andere katalytisch wirkende Agentien, zersetzt wird.

Freedericksz[1]) findet bei der Kartoffel, Stanek bei der Zuckerrübe die Katalase in den peripheren Schichten unter der Haut, Freedericksz in den Blättern im Mesophyll (bestätigt von Begemann). Nach Begemann[2]) geben die Epidermis und ihre Organe, Haare und Drüsenzellen weder eine Katalase — noch eine Peroxydasereaktion. In panachierten Blättern sind die grünen Teile reicher an Katalase als die farblosen (Freedericksz).

In der 6 bis 20 Tage gekeimten Gerste kommt Katalase nur im Koleoptil vor[3]).

Begemann konnte in Bestätigung einer Angabe von Freedericksz feststellen, daß die Katalase nicht an das Chlorophyll gebunden ist. Er zerrieb kleine Stückchen von Lemna minor mit Kieselgur möglichst fein und konnte durch Schieben und Reiben unter dem Deckgläschen einzelne Chloroplasten isoliert betrachten. Sie entwickelten mit Wasserstoffperoxyd keinen Sauerstoff.

Nach Woker und Begemann sind Katalase und Peroxydase identisch.

Über Katalase vgl. noch: G. Lakon, Eine Methode, die Wirkung der Katalase an der lebenden Pflanze zu demonstrieren, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1922, XL (17). G. Lopriore, Die Katalasereaktion und die Biologie des Pollens, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1928, XLVI, S. 413.

Oxydoredukasen (Reduktasen)

Unter Oxydoredukasen (Reduktasen) versteht man Enzyme, unter deren Einfluß leicht beobachtbare oder nachzuweisende Reduktionsvorgänge eintreten, während die damit verbundenen Oxydationsvorgänge in den Hintergrund treten.

Die reduzierende Wirkung der Oxydoredukasen ist am leichtesten an Farbstoffen, z. B. Methylenblau oder Janusgrün, zu beobachten, die durch sie in Leukoverbindungen übergeführt werden. Bei Reagensglasversuchen empfiehlt sich Abschluß durch ein Wattebäuschchen, das mit einer alkalischen Pyrogallollösung durchtränkt ist (Wright, Burri)[4]).

Mikrochemische Arbeiten scheinen nicht vorzuliegen.

[1]) W. Freedericksz, Sur le rôle physiologique de la catalase, Diss. Genève 1911.

[2]) O. H. K. Begemann, Beiträge zur Kenntnis pflanzlicher Oxydationsfermente. Pflügers Arch. f. die ges. Physiologie, 1915, CLXI, S. 45; Diss. Bern 1914/15.

[3]) H. v. Euler u. H. Nilsson, Enzymchemische Vererbungsstudien. Ark. Kemi, Mineral. Geol. Abt. B 10, Nr. 6, S. 1; Chem. Zentralbl., 1929, II, S. 894.

[4]) Burri läßt zur Kultur anaerober Bakterien in flüssigen Nährböden

V. Enzyme, die auf N-haltige Verbindungen einwirken

Urease

Die Urease hat die Aufgabe, den Harnstoff der Pflanzen (s. S. 275) in Ammoniak (und Kohlensäure) umzuwandeln; sie kann deswegen gleichzeitig mit dem Harnstoff in den Pflanzen vorkommen (Fosse)[1].

Urease ist in Kryptogamen (Bakterien, Pilze) wie in Phanerogamen weit verbreitet (Zemplén, Kiesel, Goris u. a.). Wasicky u. Krach fanden sie in allen von ihnen untersuchten Kryptogamen und Phanerogamen. Die Blätter enthalten immer Urease und sind immer daran reicher als Stengel und Wurzel. In Samen kommen sie häufig vor, so in den meisten Papilionaceen-Samen (Zemplén[2]). Im Mesokarp von Früchten wurde sie von Wasicky u. Krach nicht gefunden. Aus dem weiten Vorkommen der Urease schließen Wasicky u. Krach[3]), daß sie den Harnstoff-Stoffwechsel jeder Pflanze regelt.

Zum Nachweis der Urease legt man nach Wagenaar[4]) die Schnitte in eine 2proz. Harnstofflösung, setzt ein Tröpfchen $N/_{10}$-Schwefelsäure zu und färbt nach zwei Minuten mit Methylrot (0,2 mg in 100 ccm Weingeist). Die Urease enthaltenden Zellen färben sich gelb, die davon freien bleiben deutlich rosa.

Beijerinck brachte die zerstoßenen Samen auf eine harnstoffhaltende Hefe-Gelatineplatte (100 ccm Hefeauszug, 10 g Gelatine, 2 g Harnstoff). Durch Reaktion des Ammonkarbonats mit Kalksalzen und Phosphaten bildet sich um die Gegenstände ein Ring, der Newtonsche Interferenzfarben zeigt (Irisreaktion).

Wasicky[5]) empfiehlt folgende Verfahren: a) Man legt den Schnitt in einen Tropfen einer Mischung von 10 cm³ 10proz. wässeriger Harn-

das Reagensglas erst mit einem ziemlich tief in das Glas hineingestoßenen sterilen Wattepropfen verschließen. Auf diesen kommt ein zweiter Watteprop f, auf den je 1 ccm 20proz. Pyrogallollösung und 20proz. Kalilauge gegossen wird. Dann wird mit einem vorher schnell an den Wandungen mit Wasser benetzten Kautschukpropfen verschlossen.

[1]) R. Fosse, Présence simultanée de l'urée et de l'uréase dans le même végétal, Compt. rend. Acad. sciences, Paris 1914, CLVIII, S. 1374.

[2]) G. Zemplén, Über die Verbreitung der Urease bei höheren Pflanzen. Zeitschr. physiol. Chem., 1912, LXXIX, S. 94; vgl. auch H. E. Annett, The urease content of certain Indian seeds, Biochem. Journ., 1914, VIII, S. 449.

[3]) R. Wasicky u. S. Krach, Zur Verbreitung der Urease im Pflanzenreich, Österr. bot. Zeitschr., 1928, LXXVII, S. 271.

[4]) M. Wagenaar, Bijdrage tot de kennis der localisatie van urease in sojaboonen, Pharmac. Weekbl., 1924, LXI, Nr. 20.

[5]) R. Wasicky, Nachweis und Bestimmung von Fermenten in Pflanzengeweben mit Ausnahme der Bakterien in Die Methodik der Fermente von Oppenheimer u. Pincussen, S. 1473.

stofflösung und 1 ccm Neßlers Reagens. Die ureasehaltigen Zellen werden in wenigen Minuten gelb, dann allmählich gelbbraun. Kontrolle mit Neßlers Reagens ohne Zusatz von Harnstoff erforderlich..

b) Man bringt den Schnitt in einen Tropfen einer filtrierten Lösung von je 5,0 g Magnesiumazetat und sekundärem Natriumphosphat in 100 ccm Wasser und dazu einen Tropfen einer 10 proz. Harnstofflösung. Der nach 10 Minuten ausfallende amorphe Niederschlag wandelt sich innerhalb 2 Stunden in Kristalle von Ammoniummagnesiumphosphat um. Erhitzt man nach 10 Minuten, so treten Kristalle in den Zellen auf.

Wasicky und Krach empfehlen außerdem Platinchlorid, Rhabarberanthrachinone und Hämatoxylin zum Nachweis des aus Harnstoff durch die Urease abgespaltenen Ammoniaks.

1. Man bringt einen dünnen Schnitt auf einen Objektträger, bedeckt mit einem Deckglas, saugt drei- bis viermal 95proz. Weingeist durch den Schnitt und setzt eine 10proz. Harnstofflösung so zu, daß man von der einen Seite die Harnstofflösung zufließen läßt, von der anderen den Weingeist mit einem Filtrierpapierstreifen absaugt. Nach Zusatz eines Tropfens Platinchlorid läßt man das Präparat 30 Minuten in der feuchten Kammer liegen und sucht dann unter dem Mikroskop nach den Oktaëdern des Ammonium-Platinchlorids. Kontrollversuch ohne Harnstoff.

2. Man befeuchtet den Schnitt mit einer weingeistigen Lösung von Rhabarberanthrachinonen, läßt den Weingeist abdunsten, fügt Harnstofflösung zu und betrachtet unter dem Mikroskop. Die Urease enthaltenden Zellen färben sich purpurn.

3. Man läßt den Schnitt 10 Minuten in einer Hämatoxylinlösung (0,2 g Hämatoxylin in 10 ccm 80proz. Weingeist + 2 Tropfen $N/_{10}$-Salzsäure). Man bringt den Schnitt dann auf einen Objektträger, bedeckt ihn nach Verdunsten des Weingeists mit Harnstofflösung und betrachtet unter dem Mikroskop. Bei bejahenden Ausfall färbt sich der Schnitt rotviolett. Abschluß des Deckglasrandes mit Paraffin zur Ausschaltung der Laboratoriumsluft vorteilhaft. Blinder Versuch mit einem vor Zusatz des Harnstoffs erhitzten Schnitt.

Das optimale pH der Reaktion liegt bei 7,3—7,5; bei stark saurer Reaktion neutralisiert man zuerst mit $N/_{100}$-Lauge. Auch Gerbstoff stört.

In zweifelhaften Fällen verfährt man nach Wasicky und Krach folgendermaßen:

Man verreibt ein wenig — von ureasereichen Geweben einige Schnitte — des zu untersuchenden Gewebes in einer Achatreibschale mit feinem Sand und der zehnfachen Menge Wasser, zentrifugiert, versetzt die abgetrennte Flüssigkeit mit dem mehrfachen Volumen starken

Weingeists und zentrifugiert abermals. Den Niederschlag versetzt man mit einem Tropfen Hämatoxylin und 2 ccm 10proz. Harnstofflösung und überschichtet mit Paraffinöl. Bei Anwesenheit von Urease färbt sich die wässerige Lösung rotviolett.

In den Sojasamen ist die Urease nach Wagenaar folgendermaßen lokalisiert. Der äußerste Teil der Keimblätter ist reich an Urease, nach innen nimmt der Gehalt daran ab. Die Gefäßbündelchen enthalten Urease, ein sie umschließender Kranz von Zellen ist davon frei, ebenso die Samenschale.

In den Blättern findet sich die Urease nach Wasicky und Krach im Mesophyll, gelegentlich (Bellis perennis) auch in Spaltöffnungen und Haaren.

Proteolytische Enzyme

Die Proteasen hydrolysieren die Säureamidbindungen der Eiweißstoffe und erzeugen stets NH_2 und $COOH$ in äquivalenten Mengen.

Zum Nachweis peptolytischer Enzyme (in den Kannen von Nepenthes u. a.) würde sich wahrscheinlich die Methode von Abderhalden und Schittenhelm[1]) mikrochemisch (auch in Präparaten) verwenden lassen. Es gelangen hierbei leicht lösliche Polypeptide zur Anwendung, die größere Mengen schwer löslicher und leicht kristallisierbarer Aminosäuren enthalten. Die eingetretene Spaltung wird an den ausgeschiedenen Kristallen erkannt. Benutzt wird eine klare 25proz. Lösung von Seidenpepton, die mit Natriumbikarbonat ganz schwach alkalisch gemacht ist. Sie wird mit der Enzymlösung und etwas Toluol versetzt und in den Brutschrank gebracht. Bei Gegenwart von peptolytischen Enzymen werden sich Tyrosinkristalle bilden. Später hat Abderhalden[2]) eine 10proz. Glycyl-l-tryptophanlösung benutzt, aus der peptolytische Enzyme Tryptophan abspalten, welches mit Brom eine violette Farbenreaktion gibt. Die Schnitte kommen in die Lösung, die mit Toluol überschichtet wird, werden nach 12 bis 48 Stunden herausgenommen, abgespült und Bromdämpfen ausgesetzt. In vielen Fällen zeigte die nun eintretende Violettfärbung, die gut lokalisiert war, den Sitz der Enzyme an (besonders werden die Gefäße gefärbt!).

Fermi und Buscalioni[3]) haben proteolytische Enzyme in Phanerogamen und in einigen Mykorrhizen nachzuweisen gesucht, indem

[1]) E. Abderhalden u. A. Schittenhelm, Über den Nachweis peptolytischer Fermente, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1909, LXI, S. 421.

[2]) E. Abderhalden, Notiz zum Nachweis peptolytischer Fermente in Tier- und Pflanzengeweben, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1910, LXVI, S. 137.

[3]) C. Fermi u. L. Buscalioni, Die proteolytischen Enzyme im Pflanzenreiche, Centralbl. f. Bakter., 1899, V, 2. Abt.

sie die betreffenden Schnitte auf eine karbolsäurehaltige Gelatineplatte brachten. Verflüssigung derselben wurde auf die Gegenwart proteolytischer Enzyme gedeutet.

Shibata[1]) wählte makrochemische Methoden. Die abgetrennten Mykorrhizen wurden mit destilliertem Wasser gewaschen, getrocknet, mit Glyzerin verrieben. Der Glyzerinbrei blieb eine Woche in verschlossenem Glaskolben unter öfterem Umrühren stehen, wurde dann durch Leinwand filtriert und mit dem 1—3fachen Volumen destillierten Wassers versetzt. In diese mit 0,05—0,1 % Salzsäure angesäuerte Flüssigkeit wurden kleine Fibrinstückchen gebracht. Die so beschickten Flüssigkeiten wurden auf 4—5 Stunden, auch länger, im Thermostaten gehalten und die Lösung der Fibrinstücke festgestellt.

Die Proteasen des Zellsaftes können nach der Chromogrammmethode von Grüss, s. S. 700, nachgewiesen werden. Hierzu benutzt man ein mit Albumose durchtränktes Filtrierpapier, „laugt nach der Kapillarisation die Peptone aus und bringt das restierende Eiweiß durch Färbung zum Vorschein".

Anhang

Urtica-Enzym

Das giftige Sekret der Brennhaare von Urtica dioica wird von Haberlandt[2]) für eine Substanz gehalten, „welche sich in bezug auf manche Eigenschaften den ungeformten Fermenten oder Enzymen anschließt". Ein Alkaloid soll nicht vorliegen, da der Körper „gleich einem Enzym durch Alkohol fällbar und in Wasser neuerdings löslich ist". Werden die Trichome 10—20 Sekunden in kochendes Wasser getaucht, dann ist der Zellsaft feinkörnig koaguliert, opak, weißlich und gibt Eiweißreaktion (Millon, Raspail). An Herbstmaterial ruft Schwefelsäure eine rote Färbung hervor. Der Saft gibt mit Kupfersulfat und Bleiazetat einen gelbbraunen Niederschlag, Salpetersäure färbt gelb, Jodtinktur gelbbraun.

Nestler[3]) schließt aus seinen Versuchen, daß die Brennesselwirkung zum mindesten nicht allein einem Enzym zugeschrieben werden kann. „Die erste Schmerzempfindung nach dem Eindringen des Brennhaares in die Haut ist auf die mechanische Wirkung des Stiches und auf die Wirkung der Ameisensäure zurückzuführen.

Nach Flury[4]) aber ist das eigentliche Brennesselgift eine nicht-

[1]) K. Shibata, Cytologische Studien über die endotrophen Mykorrhizen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1902, XXVII, S. 670.

[2]) G. Haberlandt, Beiträge zur Anatomie und Physiologie der pflanzlichen Brennhaare, Sitzgsber. Wien. Akad., 1886, XCIII, 1. Abt., S. 223.

[3]) A. Nestler, Zur Kenntnis der Wirkung der Brennhaare unserer Urtica-Arten, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1925, XLIII, S. 497.

[4]) F. Flury, Über die Bedeutung der Ameisensäure als natürlich vorkommendes Gift, Ber. deutsch. pharmaz. Ges., 1919, XXIX, S. 650; derselbe, Über die chemische Natur der Nesselgifte, Zeitschr. f. d. ges. exp. Medizin, 1927, LVI, S. 402.

flüchtige, stickstoffreie, ungesättigte Säure, die in naher Beziehung zu den Harzsäuren zu stehen scheint. Auch die entzündungserregenden Stoffe der Loasaceen scheinen zur gleichen chemischen und pharmakologischen Gruppe zu gehören.

III. Der Protoplast

Nach Arthur Meyer[1]) lassen sich in der Zelle folgende Formbestandteile unterscheiden: I. Der Protoplast. A. Die protoplasmatischen Organe. a) Das Cytoplasma. b) Die Trophoplasten. c) Der Zellkern. d) Die alloplasmatischen Gebilde, z. B. Geißeln.

II. Die ergastischen Gebilde, einzuteilen vom topographischen Standpunkte in Einschlüsse und Ausscheidungen, vom physiologischen Standpunkte in ergastische Gebrauchsgebilde, Sekretgebilde und Stützgebilde.

Als Cytosomen faßt Lundegårdh „die in Größe oder Gestalt oder physikalischen Eigenschaften sich von der feineren Struktur des Cytoplasmas unterscheidenden Bildungen zusammen. Sie sind im wesentlichen identisch mit den Allinanten von Arthur Meyer. Hierher gehören die Chondriosomen, Mitochondrien, Plastosomen, Plastochondrien, Chromidien, „Karyoide", „Vibrioide" u. a. m.

Protoplasma

Die Ansichten über Aufbau und Bedeutung des Protoplasmas gehen sehr weit auseinander. Vgl. dazu das Sammelreferat von N. Gaidukov in Protoplasma, 1929, VI, S. 162[2]) und das von W. W. Lepeschkin, ebenda, 1930, IX, S. 269[1]). Nach Gaidukov, der das Protoplasma als dynamischen und nicht als statischen Begriff behandelt, ist das Protoplasma nur der Raum, in welchem sich die grundlegenden elementaren Lebenserscheinungen vollziehen und nicht die Ursache der Lebenserscheinungen, „sondern selbst Resultat der Wirksamkeit elementarer Abläufe". Einheitlichkeit der Eigenschaften bestehe weder im lebenden, noch im toten Plasma.

Lepeschkin, der den Namen Protoplasma dem — in verschiedenem Sinne gebrauchten — Cytoplasma vorzieht, versteht darunter die meist farblose Art von lebender Materie, die den Zellkern — ebenfalls eine Art lebender Materie — umgibt.

[1]) A. Meyer, Morphologische und physiologische Analyse der Zelle der Pflanzen und Tiere (Jena 1920), S. 32; Das ergastische Organeiweiß und die vitülogenen Substanzen der Palisadenzellen von Tropaeolum majus, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1917, XXXV, S. 658.

[2]) Daselbst zahlreiche Literaturangaben über Arbeiten, die das Protoplasma betreffen.

Auch unser Wissen über die chemische Zusammensetzung des Protoplasmas ist noch roh und unbefriedigend. „Wir müssen annehmen, daß viele von den wohl äußerst labilen Substanzen des eigentlichen Protoplasmas — während der Verarbeitung zerstört und unkenntlich verändert werden. Ein Teil dieser veränderten Körper muß, als der jetzigen Untersuchungsmethodik unzugängliche Trümmer, beiseite gelassen werden; ein anderer Teil kann in Form von chemisch definierbaren und faßbaren Körpern abgeschieden werden, dabei aber nur in unserer noch irrtümlichen Vorstellung die Stellung von richtigen nativen Substanzen des Protoplasmas einnehmen. Viele quantitativ zurücktretende Körper müssen übersehen und unserer Beobachtung entzogen werden, da wir ihre kleinen Mengen nicht fassen und identifizieren können. Ein Teil davon muß wohl in adsorbiertem Zustande den abtrennbaren kolloiden Stoffen unmerklich beigemengt sein, deren wirkliche Reindarstellung uns wohl jetzt kaum möglich ist. Die Trennung der verschiedenen kolloidalen Bestandteile voneinander stellt ebenfalls noch unüberwindliche Schwierigkeiten vor. Infolgedessen können Gemenge von Stoffen als individuelle Körper erscheinen. Durch die nicht zu vermeidende physikalische Zerstörung des Protoplasmas während der Analyse müssen Mischungen und Verschiebungen entstehen, bei denen die früher getrennt vorhandenen Stoffe zusammentreffen, mit einander reagieren und einander chemisch und physikalisch verändern." (Kiesel)[1]).

Das Protoplasma der Zelle, „im wesentlichen eine Mischung organischer Kolloide", „ein heterogenes komplexes System koexistierender Phasen" besitzt die Fähigkeit der Reizbarkeit, der Kontraktilität, der Nahrungsaufnahme, des Wachstums usw., kurz, Protoplasma ist ein biologischer Begriff. Es besteht aus einer sehr zähen Emulsion (Dichte durchschnittlich 1,045), in der festere Teilchen suspendiert sind. In der jugendlichen Zelle erfüllt das Cytoplasma völlig das Zellumen. Nach Vereinigung der Vakuolen zu einem großen Saftraum bildet das Plasma schließlich nur einen zarten Belag, der der Zellwand anliegt (Primordialschlauch). Der Plasmaschlauch ist dann schwer zu erkennen und muß durch Färbung und Plasmolyse (s. d.) oder durch Schwefelsäure (s. Zellulose) sichtbar gemacht werden. Vielfach, besonders bei mechanischen Elementen, wird das Plasma völlig oder doch nahezu vollständig verbraucht.

Im Protoplasma finden sich u. a. Proteide, Nukleoproteide, Phosphatide, Sterine, Aminosäuren, Fette, Kohlenhydrate, Salze, Enzyme.

Chemische Zusammensetzung des Plasmas (Plasmodium von Fuligo varians): Wasser 82,6 %. In der Trockensubstanz 40,7 % wasserlösliche organische Stoffe (hauptsächlich in Vakuolen), Monosaccharide 14,2 %, Eiweißkörper 2,2 %, Aminosäuren, Purinbasen, Asparagin usw. 24,3 %. In Wasser unlösliche Stoffe (Grundmasse des Protoplasmas) Nukleoproteide 32,3 %, freie Nukleinsäuren 2,5 %, *Globulin* 0,5 %, *Lipoproteide* (*Plasmatin*) 4,8 %, *neutrale Fette* 6,8 %,

[1]) A. Kiesel, Die Plasmodien der Myxomyceten als Objekt der chemischen Protoplasmauntersuchung (Sammelreferat), Protoplasma, 1929, VI, S. 332.

Phytosterin 3,2 %, Phosphatide 1,3 %. Übrige organische Stoffe (Polysaccharide, Farbstoffe, Harze) 3,5 %, Mineralstoffe (ungefähr zur Hälfte wasserlöslich) 4,4 % (Lepeschkin)[1].

Das Plasmodium von Reticularia lycoperdon fand Kiesel folgendermaßen zusammengesetzt: Öl 17,85 %, Lecithin 4,67 %, Cholesterin 0,58 %, reduzierende Kohlenhydrate 2,74 %, nicht reduzierende lösliche Kohlenhydrate (mit Ausnahme von Glykogen) 5,32 %, Glykogen 15,24 %, schwer hydrolysierbares Polysaccharid 1,78 %, N-haltige Extraktivstoffe 12,00 %, Eiweiß (zum Teil im Nukleoproteid) 20,65 %, Plastin 8,42 %, Nukleinsäure 3,68 %, Öl der Lecithoproteide (?) 1,20 %, unbekannte Stoffe 5,87 %.

Lepeschkin nimmt an, daß Eiweiß und Lipoide des Protoplasmas in einer chemischen Bindung miteinander stehen. Das gehe u. a. daraus hervor, daß lebendes Protoplasma im Gegensatz zu den Eiweißstoffen und den Lipoiden nicht durch Anilinfarbstoffe gefärbt wird. Auch Versuche von Biedermann und Walter sprechen dafür. Für eine enge Verbindung zwischen den Lipoiden und Eiweißstoffen des lebenden Protoplasmas spreche auch die Tatsache, daß die Fähigkeit der Narkotika, im Protoplasma die Eiweißstoffe vollständig zu koagulieren und es so zu töten, mit der Lipoidlöslichkeit der Narkotika wächst. Die manchmal zu beobachtende Färbbarkeit des Plasmas durch Anilinfarbstoffe spricht dafür, daß eine leichte Zersetzung der Verbindung eingetreten ist.

Fig. 155. Pelargonium roseum (jugendliche Drüse), die Sezernierungszelle [illegible] Vakuolenbildung (Tunmann)

Bütschli hatte dem Plasma Wabenstruktur zugeschrieben, eine Anschauung, die außer zahlreichen Gegnern auch viele Anhänger gefunden hat, darunter L. Rhumbler[2]. Er schließt aus seinen Versuchen, daß „das Protoplasma sich physikalisch niemals wie eine einheitliche Flüssigkeit verhält, sondern stets mechanische Eigentümlichkeiten verrät, die physikalisch nur dadurch erklärt werden können, daß das Protoplasma aus zwei Flüssigkeitskategorien, Hyaloplasma und Enchylema (Bütschli) schaumartig zu einem Spumoid zusammengemengt ist, dessen Einzelbestandteile in jeder Kategorie, also ebensowohl in dem zähflüssigeren, die Schaumwände formierenden Hyaloplasma, als auch in dem, den Schaumkämmercheninhalt darstellenden Enchylema chemisch-physikalisch verschieden sein können.

Typische Bütschlische Wabenstruktur besitzt nach Seifriz[3]) das Ektoplasma der Ciliate Euplotes.

---

[1]) W. W. Lepeschkin, Über die chemische Zusammensetzung des Protoplasmas des Plasmodiums, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1924, XLI, S. 179.

[2]) L. Rhumbler, Das Protoplasma als physikalisches System, Ergebnisse der Physiologie, 1914, XIV, S. 474; hier auch zahlreiche Literaturangaben.

[3]) W. Seifriz, The alveolar structure of protoplasm, Protoplasma, 1930, XI, S. 1.

Ein Gegner der Bütschlischen Ansicht ist u. a. Lepeschkin, der die Eigenschaften des Protoplasmas allein aus dessen kolloiden Eigenschaften erklären will.

Holländische Forscher rechnen mit der Möglichkeit, daß die Grundsubstanz des Plasmas oder des Kerns die Natur eines Komplexkoazervates besitzt (H. G. Rungenberg de Jong u. H. R. Kruyt, Proc. Acad. Sc. Amsterdam, 1929, XXXII, S. 849, Kolloid-Zeitschr., 1930, L, S. 39; s. auch Biochem. Zeitschr., 1930, CCXXI, S. 392).

Nach A. Meyer ist das Cytoplasma der Pflanzen und Tiere eine optisch (und auch physiologisch) homogene[1]) wässrige Lösung. Die Mikrosomen und auch die nur ultramikroskopisch sichtbaren Einschlüsse sind solange als kleine Massen ergastischer Substanzen zu betrachten, bis es nachgewiesen ist, daß sie zu einer anderen Art von Gebilden gehören. Auch gut gefärbtes und fixiertes Cytoplasma ist nach A. Meyer homogen. Dies geht besonders aus Beobachtungen an Präparaten hervor, die mit Osmiumsäure oder neutraler Lösung von Goldchloridnatrium behandelt werden; Zusatz von Säuren hebt die Homogenität des Plasmas auf.

Nach demselben Autor sind die Eiweißstoffe ergastische Gebilde der Zelle und beteiligen sich nicht am Aufbau der Organe des Protoplasten. Das eigentliche Protoplasma soll aus hypothetischen amikroskopischen Körpern, „Vitülen", bestehen, die die „vererbbare Maschinenstruktur" des Protoplasten tragen sollen.

Wahrscheinlich ist das lebende Plasma eine kolloidale Lösung emulsionsartiger Natur, die unter gewissen Bedingungen „in gallertartigen Schaum mit flüssigen Wabenwänden übergehen kann" (W. Lepeschkin, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1911, XXIX, 188).

Als Dispersionsmittel des kolloiden Systems Protoplasma betrachten Ettisch und Péterfi[2]) entgegen Lepeschkin[3]) Wasser oder eine wässerige Elektrolytlösung.

„Die Emulsion kann hierbei je nach den Dispersionsverhältnissen und der relativen Menge und Konsistenz der Bestandteile sehr feine Tröpfchen enthalten („Körnerplasma") — die wohl auch Körner, Kriställchen, kleine Vakuolen usw. sein können; oder die Tröpfchen haben längliche Gestalt oder sind netzartig verbunden; oder es sind statt dessen fädige Differenzierungen vorhanden oder es liegt eine Waben-(Alveolar-Schaum-)Struktur vor, mit oder ohne zugleich vorhandene Mikrosomen, Vakuolen, Fäden usw. " (Lundegårdh).

„Doch ist zu betonen, daß im Gebiet der Kolloide kein strenger Unterschied zwischen fest und flüssig möglich ist, weil alle Arten von Zähflüssigkeit vorkommen und die Kolloide durch Änderung des Dispersionszustandes Mittel besitzen, die innere Reibung außerordentlich zu variieren" (Lundegårdh).

---

[1]) Im Gegensatz dazu ist Lundegårdh der Ansicht, daß Homogenität (optische Leerheit) kein Kriterium für das Plasma ist (H. Lundegårdh, Zelle und Cytoplasma, Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. I, Berlin 1921).

[2]) G. Ettisch u. T. Péterfi, Elektrometrische Untersuchungen an Amoeba terricola L., Pflügers Arch. f. die ges. Physiologie, 1925, CCVIII, S. 467.

[3]) W. W. Lepeschkin, Die Kolloidchemie des Plasmas, Berlin 1924. Derselbe, Über metabolisierte Schichten des Protoplasmas der Pflanzenzellen, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1926, XLIV, S. 7.

Mikrurgische Versuche zeigen, daß das Plasma, auch das strömende, nicht flüssig, sondern elastisch ist (Scarth)[1]).

Es gibt sicher Cytoplasma, das statt Waben feine Tröpfchen oder Fäden enthält, und es gibt auch strukturloses Plasma, und ferner können in gewissen Zuständen Fäden entstehen (Lundegårdh). Nach Seifriz verlangen Polarität und andere physikalische Eigenschaften des Plasmas eine Kontinuität der Struktur und damit das Vorhandensein linearer Einheiten innerhalb der kontinuierlichen Phase der gröberen Emulsion.

Viskosität und Aggregatzustand des Protoplasmas sind veränderlich. Im passiven Zustand, so im Samen, ist es fest und wird beim Übergang in den aktiven Zustand flüssig. In jungen Zellen ist die Viskosität des Protoplasmas so groß, daß das Protoplasma fest (gelatinös) wird. Innere Teile des Protoplasmas können manchmal eine teilweise Verfestigung erfahren, so in der Karyokinese (Lepeschkin).

„Die Mannigfaltigkeit der Entmischungsfiguren lebender Protoplasten zeigt, daß der Strukturbegriff im Sinne einer stabilen Anordnung elementarer Teile in Form von Tröpfchen, Fäden usw., die selbst jenseits der Sichtbarkeitsgrenze liegen, zweifellos zu enge gefaßt ist und nur gezwungen zur Erklärung der wirklich beobachteten Bilder dienen könnte" (Gicklhorn).

Vgl. auch H. Desvaux, La structure moléculaire de la cellule végétale, Bull. soc. bot. France, 1928, LXXV, S. 88; M. Copisarow, Über Zellenstrukturen und ihre Bildung, Kolloid-Zeitschr., 1929, XLIX, S. 309.

Am Plasma lassen sich vielfach zwei Schichten unterscheiden, eine äußere hyaline (Hyaloplasma, Ektoplasma) und eine innere, zahlreiche Körnchen enthaltende (Körnerplama, Endoplasma). Die kolloidal- und grobdispersen Phasen der kolloidalen Lösung, als die Lepeschkin das Protoplasma auffaßt, sind also an der Oberfläche und im Innern ungleich stark konzentriert.

Walter[2]) betrachtet das Plasma als eine kolloidale Lösung mit mikroskopischen oder ultramikroskopischen Eiweißteilchen. Die Eiweißteilchen, besonders die kleineren, werden an der äußeren Oberfläche (Plasmahaut, Vakuolenhäute) dichter liegen, wodurch ein Gelatinieren mit teilweiser Verfestigung (Plasmamembran) stattfinden kann. Außerdem werden um jedes Eiweißteilchen regelmäßig Lipoidteilchen angeordnet sein, wodurch vielleicht eine den chemischen Verbindungen nahestehende Adsorptionsverbindung zustande kommen kann. Eine Ansammlung von Lipoidteilchen muß nach Walter auch an der äußeren Oberfläche stattfinden.

[1]) G. W. Scarth, The structural organisation of plant protoplasm in the light of micrurgy, Protoplasma, 1927, II, S. 189.

[2]) H. Walter, Ein Beitrag zur Frage der chemischen Konstitution des Protoplasmas, Biochem. Zeitschr., 1921, CXXII, S. 86.

Bei unbehauteten Pflanzenzellen, z. B. Plasmodien, kann sich die oberflächliche Protoplasmaschicht zu einer festen (gallertartigen) Pellicula ausbilden, einem verdichteten Protoplasma (Lepeschkin).

Der Hydrosolkomplex des Plasmas wird von einer Hydrogelschicht umgeben, die die Funktionen eines Schutzkolloids hat (Gaidukov)[1].

An der Innenepidermis der Zwiebelschuppen von Allium cepa stellte Weis[2]) fest, daß eine besondere dünne, unsichtbare Grenzschicht den plasmolysierten Protoplasten umkleidet und daß die Grenzschichten im wesentlichen Lipoidcharakter haben. „Durch Pepsin, Trypsin und phosphatasehaltiges Autolysat aus Sinapissamen wird das Plasma von Allium, Elodea und Sinapis zu einem beträchtlichen Teile verdaut. Die Plasmafäden werden dagegen auch nach langer und kombinierter Einwirkung der Enzyme auffällig wenig geschädigt. Entgegen den neuerdings geäußerten Ansichten besteht also das Pflanzenplasma zu einem großen Teile aus unmittelbar verdaulichem Eiweiß, das durch die Plasmalipoide nicht geschützt ist, die Fäden aber keinesfalls ausschließlich aus Phosphatiden".

Die Beschaffenheit der äußersten Schicht des Protoplasmas spielt eine Rolle in den Erörterungen über seine osmotischen Eigenschaften. Die von Pfeffer entwickelte Analogie mit den künstlichen semipermeablen Membranen scheint nach neueren Untersuchungen nicht zuzutreffen. Weiteres darüber siehe etwa in Czapeks Biochemie der Pflanzen; in Höber, Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe; Lepeschkin, Protoplasma, 1930, IX, S. 278; Bärlund, Permeabilitätsstudien an Epidermiszellen von Rhoeo discolor, Acta botanica Fennica, 1929, V, S. 1; Ref. in Protoplasma, 1930, IX, S. 339.

Ultramikroskopisch erscheint das Plasma weiß, auch blau; die blaue Farbe ist eine Folge der Beugungserscheinung (N. Gaidukov, Ber. bot. Ges., 1906, XXIV, S. 110). Das Plasma ist meist farblos (bei Thioploca schwach bläulich), mischt sich nicht mit Wasser, und da es stärker lichtbrechend als dieses ist, so sind im gewöhnlichen Lichte selbst feine Plasmastränge noch gut zu erkennen. Mikrochemisch wird der Nachweis von Eiweiß zur Feststellung von Plasma meist genügen. Auch der Plastinnachweis kann geführt werden. „Das Zellprotoplasma", sagt Zacharias (Lit. S. 674, 2), „quillt in verdünnter Salzsäure, nicht aber in Glaubersalzlösungen. Es färbt sich in Essigkarmin verschwommen, schwach oder gar nicht. Nach der Behandlung mit verdünnter Salzsäure färbt es sich rot in Methylenblau-Fuchsin S. In Magensaft quillt

[1]) N. Gaidukov, Das Protoplasma als dynamischer Begriff, Protoplasma, 1929, VI, S. 162.

[2]) A. Weis, Beiträge zur Kenntnis der Plasmahaut, Planta, 1925, I, S. 145.

das Zellplasma, bleibt aber im wesentlichen ungelöst. Die Verdauungsrückstände erscheinen in verdünnter Salzsäure blaß und glanzlos, quellen nicht in Salzsäure von höherer Konzentration, färben sich hellrosa bis rot in Methylenblau-Fuchsin S, quellen oder lösen sich in Sodalösungen verschiedener Konzentration und werden von 0,5proz. Kalilauge gelöst".

Pflanzliches Plasma wird im allgemeinen von Pepsin (und Trypsin) restlos verdaut, auch bei geschlossener, unversehrter Zellmembran, wenn man vorher durch Extraktion mit heißem Weingeist, Äther und Chloroform die darin enthaltenen „Lipoide" herauslöst (Biedermann)[1]. Zum Nachweis der Lipoide im Plasma legt man zunächst 24 Stunden in Pepsin-Salzsäure und dann längere Zeit in Thymolwasser. Die Lipoide erscheinen dann als stark lichtbrechende Tröpfchen oder Myelinformen.

Das Plasma von Elodea wird aber durch Pepsinsalzsäure nicht verdaut, durch Trypsin-Soda erst nach Plasmolyse und Extraktion durch Weingeist (Biedermann)[2]. Derselbe Autor fand Lipoide auch im Protoplasma der Schuppen von Monotropa hypopitys und im Rindengewebe von Monotropa und Orobanche[3].

Eine eingehende Kritik der Anschauungen über die Grenzschichten des Protoplasmas, besonders auch der Arbeiten von Hansteen-Cranner und Grafe, findet sich bei F. C. Steward, Phosphatides in the limiting protoplasmic surface, Protoplasma. 1929, VII, S. 602; vgl. ferner R. Mond, Einige Untersuchungen über Struktur und Funktion der Zellgrenzschichten, Protoplasma 1930, IX, S. 318.

Über **interzellulares** Plasma ist mehrfach berichtet worden. Hierzu gaben Veranlassung die mit Jod mehr oder weniger reagierenden Massen und Bildungen, welche die Interzellularräume auskleiden. Russow[4], Berthold[5], Schaarschmidt u. a. traten für interzellulares Plasma ein, Frank (Pflanzenphys., S. 154) sprach von einer

[1]) W. Biedermann, Beiträge zur vergleichenden Physiologie der Verdauung, VII, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol., 1919, CLXXIV, S. 358; derselbe, Über Wesen und Bedeutung der Protoplasmalipoide, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol., 1924, CCII, S. 223.

[2]) W. Biedermann, Mikrochemische Beobachtungen an den Blattzellen von Elodea, Flora, 1918, N. F. XI—XII, S. 560.

[3]) W. Biedermann, Der Lipoidgehalt des Plasmas bei Monotropa hypopitys und Orobanche (speciosa), Flora, 1919, N. F. XIII, S. 133.

[4]) E. Russow, Über den Zusammenhang der Protoplasmakörper benachbarter Zellen, Sitzgsber. Dorpat. Naturf. Ges., 1883, VI, 562 u. 1882, V, 350.

[5]) G. Berthold, Über das Vorkommen von Protoplasma in Interzellularräumen, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1884, II, S. 20.

„inneren Cuticula", Gardiner[1]), Schenck[2]), Buscalioni[3]) brachten die Bildungen mit Produkten der Mittellamelle in Verbindung. Mattirolo und Buscalioni benutzten bei Lycopus künstlichen Magensaft. Die Auskleidungen entstehen durch Spaltung der Mittellamelle, die eine chemische Metamorphose erleidet; sie färben sich mit Chlorzinkjod nur schwach und sind in Schwefelsäure löslich. Abweichend scheint es sich mit den Befunden von Kny[4]) zu verhalten, der interzellulares Plasma für die Kotyledonen der Leguminosensamen (Pisum, Lupinus u. a.) angibt. Die Keimblätter sind von Interzellularen durchzogen, welche neben Gasen eine schleimige Füllmasse führen, die bei der Keimung verbraucht wird. Zur Untersuchung läßt man die Samen 24 Stunden in Wasser quellen. Die Aleuronkörner sind dann zerfallen, das Cytoplasma bildet eine körnige bräunliche Masse. In den Interzellularen sind die die Beobachtung störenden Gase entwichen, die Füllmasse ist nun deutlich sichtbar und gleicht dem Cytoplasma; organisierte Gebilde fehlen. Zellplasma und Interzellularplasma zeigten gleiche Eiweißreaktionen (Jodreagentien, Millons Reagens, Biuretreaktion u. a.) und gleiche Färbungen (Eosin, Fuchsin, Safranin, Anilinblau, Karmin u. a.). Von Verdauungsflüssigkeiten (Pepsin-Glyzerin, Salzsäure), in welche die Schnitte teils direkt, teils nach 24stündiger Alkoholbehandlung gebracht wurden, wird das Interzellularplasma weit schneller gelöst als das Zellplasma, und zwar vollständig. — In den interzellularen Sekretbehältern konnte Tunmann keine plasmatischen Substanzen nachweisen (Pharm. Ztg., 1907, LII, S. 353).

Extramembranöses Plasma[5]) soll bei Peridineen, Diatomeen und Desmidiaceen der Außenseite der Wandporen in Gestalt kleiner Knöpfchen vorgelagert sein und sich übereinstimmend mit dem Zellplasma intensiv mit Safranin und Hämatoxylin färben, während Membran und Gallerte ungefärbt bleiben. Karsten[6]) hält die Knöpfchen für Gallerttropfen.

Dem Zellsaft kommt in der Mikrochemie eine große Bedeutung zu, da in ihm die verschiedensten anorganischen und organischen Stoffe (Phosphatide, Kohlenhydrate, Farbstoffe, Pflanzensäuren, Glykoside,

[1]) W. Gardiner, The Continuity of Protoplasm in Plant-Tissue, Nature, 1885, S. 390.

[2]) H. Schenck, Über die Auskleidung d. Interzellulargänge, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1885, III, S. 217.

[3]) L. Buscalioni, Malpighia, 1889, III, S. 143.

[4]) L. Kny, Studien über interzellulares Protoplasma, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1904, XXII, S. 29 u. 347.

[5]) F. Schütt, Jahrb. f. wiss. Bot., 1899, XXXIII, S. 594 u. 1900, XXXV, S. 470.

[6]) G. Karsten, Ref. d. Arb. v. Schütt, Bot. Ztg., 1899, $LVII_2$, S. 330.

Alkaloide) gelöst sind. Er ist entweder farblos und durchscheinend klar oder mehr oder weniger stark gefärbt. Durch konzentrierte Lösungen kann der Zellsaft trüb und dickflüssig werden.

Laburu[1]) glaubt in den Zellen der Kartoffel den Golgischen Binnenapparat nachgewiesen zu haben. Stücke von einjährigen Kartoffeln von je 1 cm Länge und Breite kamen 24 Stunden in folgende Mischung: Formol 15 ccm, destilliertes Wasser 85 ccm, Urannitrat 1 g. Abwaschen mit destilliertem Wasser, 24 Stunden in einprozentige Silbernitratlösung. Abwaschen, 24 Stunden in: Hydrochinon 2 g, Formol 15 ccm, Wasser 100 ccm, Natriumthiosulfat 0,5 g. Abwaschen, Anfertigen der Schnitte, Entwässern mit 95proz. Weingeist, Origanumöl, Xylol, Balsam.

Auch Gicklhorn[2]) beobachtete in vitalgefärbten Epidermen von Iris flavescens Bilder, die auf eine mehr als bloß äußerliche Ähnlichkeit mit dem Binnennetz oder Golgischen Apparat hinzuweisen scheinen.

Um das Plasma der Chlorophyceen und Schizophyceen zu demonstrieren, verwendet F. Chodat[3]) Nigrosin nach Art des Burrischen Tuscheverfahrens.

Das Vakuom

Als Vakuom hat P. A. Dangeard die Gesamtheit des Systems definiert, das durch die Vakuolen einer Zelle gebildet wird[4]).

Die Vakuolen entstehen nach Guilliermond[5]) durch Neubildung im Cytoplasma. Außerdem ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß bei den Pilzen ein Teil der Vakuolen in Sprosse oder Zweige transportiert wird und daß bei der Zellteilung der Phanerogamen die Vakuolen auf die beiden Tochterzellen verteilt werden.

In den meristematischen Zellen der Phanerogamen erscheint das Vakuom in Form halbflüssiger Körnchen, die entweder isoliert bleiben oder Ketten und besonders wellige, häufig zu einem Netz anastomosierende Fäden bilden. Sie bestehen aus einer sehr konzentrierten

[1]) de Laburu, El aparato reticular de Golgi en el tubérculo de solanum tuberosum, Ref. in Zeitschr. wiss. Mikroskop., 1917, XXXIV, S. 123.

[2]) J. Gicklhorn, Beobachtungen über die vitale Farbstoffspeicherung, Kolloidchem. Beihefte, 1929, XXVIII, S. 367.

[3]) F. Chodat, Sur l'emploi de la nigrosine dans la technique algologique, Compt. rend. soc. phys. et d'hist. nat. Genève, 1924, XLI, S. 140.

[4]) Arthur Meyer versteht unter einer Vakuole allgemein eine von einem ergastischen Gebilde erfüllte Höhlung in einem Organ des Protoplasten; er nennt eine Vakuole, in welcher Zellsaft liegt, eine Zellsaftvakuole, eine solche, in welcher Fett liegt, eine Fettvakuole usw. Auch Mangenot ist der Ansicht, daß in einer Zelle Vakuolen von chemisch verschiedenem Inhalt liegen können.

[5]) A. Guilliermond, Le vacuome des cellules végétales (Sammelreferat mit reichlicher Literaturangabe), Protoplasma, 1930, IX, S. 133.

kolloiden Lösung und färben sich mit Neutralrot einheitlich und intensiv. Der gelöste Stoff scheint in der Regel ein in Weingeist mehr oder minder löslicher Eiweißstoff zu sein, mit dem häufig Phenolderivate (Gerbstoffe, Anthocyane) verbunden sind.

Jugendliche Formen der Vakuolen können den Jugendformen der Mitochondrien ähneln, unterscheiden sich aber schon durch die weniger regelmäßigen Formen, häufig netzige Beschaffenheit und weiter durch ihre Entwicklung zu den typischen Vakuolen der älteren Zellen mit flüssigem Inhalt und besonders durch ihre Reaktionen, wie aus folgender Übersicht hervorgeht:

Reaktion des Plasmas und des Zellsaftes

Dem Plasma und seinen organisierten Bestandteilen kommt eine alkalische Reaktion zu, während der Zellsaft überwiegend sauer reagiert. In vielen Fällen führt der Zellsaft Anthocyane (S. 561), dann kann man aus der Farbe auf die Reaktion schließen (rot = sauer, blau = neutral oder schwach alkalisch, grüngelb = stark alkalisch). Im Laufe der Vegetation ändert sich zuweilen die Reaktion des farbigen Zellsaftes, womit ein Umschlag der Färbung verbunden ist. Daß die verschiedenen Färbungen die Reaktionen des Zellsaftes anzeigen, bewies Pfeffer (Osmot. Unt., 1877, S. 140, Pulmonaria off., Tradescantia). Der rote (saure) Zellsaft nimmt durch Spuren von Ammoniak eine blaue Färbung an, die durch äußerst verdünnte Salz- oder Schwefelsäure wieder in Rot zurückgeführt werden kann, und zwar ohne das Leben der Zellen zu schädigen.

Ganz überwiegend ist der Zellsaft farblos und um dessen Reaktion, zu ermitteln, wendet man Farbstoffe als Indikatoren an. Die Farbstoffe gelangen in möglichster Verdünnung zur Anwendung, nur die Reaktion an lebenden Zellen gestattet zuverlässige Schlüsse. Die Indikatoren dürfen die lebende Zelle nicht schädigen und müssen selbst in großer Verdünnung einen scharfen Farbenumschlag erkennen lassen. Fr. Schwarz benutzte den Farbstoff des Braunkohls (Brassica oleracea var. crispa Garcke). Die farbstoffführende Epidermis der Blattstiele wird abgezogen und mit warmem Wasser (45—55°) extrahiert, die Lösung wird abfiltriert, das Filtrat durch Aufkochen vom Eiweiß getrennt und der nochmals filtrierte Indikator durch etwas Salizylsäure haltbar gemacht. Dieser Indikator zeigt folgende Farbenreaktionen: ziegelrot (stark sauer), purpurrot (sauer), rotviolett (schwach sauer), violett (neutral)[1]), blau bis blaugrün (schwach alkalisch), grasgrün (stärker

[1]) Fr. Schwarz, Morph. u. chem. Zusammens. des Protoplasmas, Cohns Beitr. 1887, V, 20 u. A. Meyer, Kritik der Ansichten von Frank Schwarz über die alkal. Reaktion des Protoplasmas, Bot. Ztg., 1890, $XLVIII_2$, S. 234.

alkalisch), gelblich (sehr stark alkalisch). Der Farbstoff der Radieschen, der zu makrochemischen Zwecken wiederholt als Indikator empfohlen wurde (Sacher, Chem. Ztg., 1910, XXXIV, 1333), wäre in wässeriger Lösung ebenfalls zu versuchen. Pfeffer[1]) benutzte künstliche Farbstoffe in wässeriger Lösung (0,01 %), so Cyanin (Blaufärbung zeigt die alkalische Reaktion des Plasmas an), Tropaeolin, Corallin, Methylorange.

Die Methoden lassen sich auch zur Ermittlung der Reaktion einzelner Bestandteile des Plasmas anwenden. Mit dem Kohlfarbstoff werden am stärksten die Zellkerne gebläut (sowohl die Nukleolen und das Chromatin als auch das Gerüst), im Cytoplasma treten die Mikrosomen besonders kräftig gefärbt hervor[2]). Chloro- und Leukoplasten besitzen ebenfalls alkalische Reaktion. Die saure Reaktion des Zellsaftes ist auf die Gegenwart der meist auftretenden Pflanzensäuren zurückzuführen.

Über die Reaktion der verschiedenen Teile der Zelle hat Schaede[3]) bei den Wurzelhaaren von Hydrocharis morsus ranae folgendes festgestellt: Das lebende Plasma färbt sich mit Chrysoidin und Bismarckbraun gelb, mit Gentianaviolett violett, ist also basisch. Das tote Plasma färbt sich mit Bismarckbraun bräunlich, mit Methylviolett und Gentianaviolett blau, mit Neutralrot und Safranin karmin, mit Säurefuchsin intensiv rot. Dies läßt auf saure Reaktion schließen. Die Mikrosomen sind wahrscheinlich sauer, der Zellsaft neutral. Die Niederschläge im Zellsaft sind sauer, da sie mit Methyl- und Gentianaviolett blauviolette, mit Safranin hellkarmine Farbe annehmen. Die Umwandlungsprodukte der Kristalle sind anscheinend amphoter.

Das Plasma der Epidermiszellen der Zwiebelschuppen von Allium cepa speichert Methylrot aus der roten sauren Lösung (0,004 %) gelb, also basisch; der Zellsaft färbt sich tiefrot (sauer), das tote Plasma nimmt einen zartroten Ton an[4]).

Gegenüber diesen Verfahren erhebt Ruhland[5]) den prinzipiellen Einwand, daß sich vitale Indikatoren wegen der durch Salze und Kolloide bedingten Fehler nicht zur Ermittlung der Plasmareaktion verwenden lassen.

[1]) W. Pfeffer, Über Aufnahme von Anilinfarben in lebenden Zellen, Tübinger Arbeiten 1886, II, S. 179.

[2]) Fr. Schwarz, Cohns Beitr. z. Biol. d. Pflanz., 1892, V, S. 12.

[3]) R. Schaede, Über das Verhalten von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarbstoffen, Jahrbücher f. wiss. Bot., 1923, LXII, S. 65.

[4]) R. Schaede, Über die Reaktion des lebenden Plasmas, Ber. deutsch. bot. Ges., 1924, XLII, S. 219.

[5]) W. Ruhland, Über die Verwendbarkeit vitaler Indikatoren zur Ermittlung der Plasmareaktion, Ber. deutsch. bot. Ges., 1924, XLI, S. 252.

Jodjodkalium, das die Mitochondrien lediglich gelb färbt, verändert die Jugendformen der Vakuolen („vacuoles mitochondrioformes") weitgehend. Durch Osmiumsäure werden letztere — unter Schwärzung — nur erhalten, wenn sie Phenolderivate enthalten, sonst werden sie zerstört, während erstere ohne Bräunung erhalten bleiben. Durch die Färbungsverfahren für Mitochondrien (s. S. 739) färben sich die jugendlichen Vakuolen im allgemeinen nicht. Wenn sie in manchen Fällen als Kanälchen erscheinen, in denen gefärbte Körner oder Fäden liegen, dann unterscheiden sie sich von den Mitochondrien immer dadurch, daß sie von einem farblosen Hof umgeben sind. Weingeist zerstört die Mitochondrien, fällt aber aus den jugendlichen Vakuolen das „Metachromatin", dessen Körperchen sich dann durch basische blaue oder violette Anilinfarbstoffe und Hämatein rötlich färben.

Die Jugendformen der Vakuolen fixieren fast augenblicklich Vitalfarbstoffe, wie Neutralrot, Kresolblau, Toluidinblau, Methylenblau, Nilblau, alles Farbstoffe, die die Mitochondrien nicht färben; die die letzteren anfärbenden Farbstoffe, wie Janusgrün, Dahliaviolett, Methylviolett, färben dagegen erstere nicht.

Über Vakuolenkontraktion vital gefärbter Elodeazellen s. F. Weber, Protoplasma, 1930, IX, S. 106.

Guilliermond macht weiter darauf aufmerksam, daß die fädigen und häufig netzigen Vakuolenformen, die man durch Neutralrot in den embryonalen Zellen der Phanerogamen und den Schlauchenden der Saprolegniaceen erhält, mit dem Golgischen Netzapparat der tierischen Zellen übereinstimmen. Andererseits hat das nach Behandlung mit dem Regaudschen Verfahren sichtbare farblose Kanälchennetz des Vakuoms eine auffallende Ähnlichkeit mit den in tierischen Zellen beschriebenen Holmgrenschen Kanälchen.

Die Silberverfahren führen meist zu keiner Imprägnierung des Vakuoms, während die Mitochondrien damit fast regelmäßig imprägniert werden, und, da sie nicht verändert werden, deren leichte Unterscheidung von dem Vakuom gestatten.

Bestimmung der Wasserstoffionen-Konzentration

Eine genaue Festlegung der Reaktion erhält man nach den Anschauungen der Ionentheorie durch die Bestimmung der Konzentration der Wasserstoffionen oder des durch logarithmische Transformation daraus hervorgehenden Wasserstoffexponenten (wenn die Konzentration der Wasserstoffionen $k = 10^{-7}$, dann wird der Wasserstoffexponent $p_H = 7$). Keller[1]) verwirft aber prinzipiell die Definierung

[1]) R. Keller, Die Elektrizität in der Zelle, 2. Aufl., 1925, S. 32; auch

des Säuregrades durch Wasserstoffzahlen und empfiehlt, die gefundenen elektrischen Potentiale in Millivolt so anzugeben, wie sie tatsächlich gefunden wurden und die rechnerische Auswertung der Experimente der künftigen Forschung zu überlassen. Leuthardt macht darauf aufmerksam, daß es angesichts der komplizierten Verteilung der Stoffe in der Zelle keinen Sinn hat, von einer Wasserstoffionen-Konzentration der Zelle schlechthin zu sprechen.

Die Bestimmung des p_H wird auf kolorimetrischem oder potentiometrischem Wege ausgeführt[1]).

Vor einer kritiklosen Ausführung von p_H-Bestimmungen mögen folgende Worte von Leuthardt schützen.

„Eine große Zahl wichtiger biologischer Vorgänge ist entweder in ihrem Ablauf an eine bestimmte Konzentration der Wasserstoffionen gebunden oder von einer charakteristischen Änderung dieser Größe begleitet. Welche Rolle aber dem Wasserstoffion im ganzen Mechanismus des Vorgangs zukommt, ist nur in sehr wenigen Fällen mit einiger Sicherheit bekannt. Aber die Untersuchungen insbesondere amerikanischer, dänischer und englischer Forscher haben gezeigt, daß das p_H eben nur ein Faktor unter vielen ist und daß uns nichts berechtigt, dem Wasserstoffion einen Vorrang vor den anderen Komponenten des Gleichgewichts einzuräumen."

Außerdem ist zu bedenken, daß das Wasserstoffion nie isoliert auftritt, sondern stets gleichzeitig mit einem Anion. „Es hält tatsächlich schwer, ein Beispiel für eine ‚reine' Wasserstoffionenwirkung zu finden. Der Einfluß des Anions begleitet immer die Erscheinungen, bald weniger hervortretend, so daß wir ihn unter Umständen als von sekundärer Bedeutung vernachlässigen können, bald aber ist er dominierend. Der Quellungsgrad von Gelatine und Fibrin, die Flockung der Kolloide sind weitgehend abhängig von der Natur der Säure. Säurewirkung und Wasserstoff-ionen-wirkung dürfen in keiner Weise identifiziert werden. Nie finden wir eine reine Wasserstoff-ionen-wirkung."

Auch die Farbe eines Indikators ist nur dann vom p_H allein abhängig, wenn sich in der Lösung keine Neutralsalze oder keine Eiweißstoffe in beträchtlicher Menge befinden.

Die kolorimetrische Bestimmung

Die kolorimetrische Bestimmung beruht im Prinzip darauf, daß man die Farbe, die eine geeigneter Farbstoff (Indikator) im Gewebe zeigt, mit den Farben vergleicht, die er in Lösungen von bekanntem p_H aufweist. Aus gleicher Farbe schließt man auf gleiches p_H. Da aber Salze und Eiweißstoffe der Gewebe die Farbe beeinflussen, so ergibt

F. Leuthardt, Grundlagen und Grenzen biologischer p_H-Bestimmungen, Kolloidchem. Beihefte, 1929, XXVIII, S. 262.

[1]) Vgl. J. Small, Hydrogen-ion concentration in plant cells and tissues, Protoplasma-Monogr. 2, Berlin 1929, Gebr. Borntraeger.

sich daraus eine Fehlerquelle, die wohl nur selten in ihrem quantitativen Wert berücksichtigt werden kann.

Über die Fehlerquellen der kolorimetrischen p_H-Bestimmung siehe auch H. Pfeiffer, Der gegenwärtige Stand der kolorimetrischen Acidimetrie in der Gewebephysiologie, Protoplasma, 1926/27, I, S. 434 und P. Reiss, L'erreur de concentration dans l'utilisation de quelques indicateurs de p_H, Archiv. de Phys. biol., 1928, VI, S. 298, Ref. in Protoplasma, 1929, VII, S. 294.

Von Gegenständen, welche Farbstoffe mit Indikatoreigenschaften enthalten, zieht man die Farbstoffe aus und bestimmt die Abhängigkeit des Farbtons vom p_H. In anderen Fällen legt man die zu untersuchenden Präparate in Indikatorlösungen.

Für die Bestimmung der Wasserstoffionen-Konzentration in Pflanzengeweben empfiehlt Pfeiffer[1]) die folgende Zusammenstellung: Metanilgelb (1,2—2,3), Tropaeolin 00 (1,3—3,2), Methylorange (3,1—4,4), alizarinsulfonsaures Natrium (3,7—5,2), Methylrot (4,4—6,2), p-Nitrophenol (5,5—7,5), Neutralrot (6,0—8,0), Rosolsäure (6,9—8,0), α-Naphtholphthaleïn (7,3—8,7) und ev. Thymolsulfonphthaleïn (8,0—9,6). Die Methode beruht darauf, daß eine jede Mischfarbe zwischen der sauren und der alkalischen Form eines Indikators einem bestimmten p_H-Wert entspricht. Man vergleicht die Färbung, die der Indikator im Schnitt erfährt, mit der Färbung von Mischungen aus seiner sauren und alkalischen Form, deren p_H-Werte aus Tabellen und einer Kurve entnommen werden können.

J. und M. Needham spritzten Amöben mittels eines Mikromanipulators Lösungen von Neutralrot, Phenolrot und Bromthymolblau ein.

Péterfi[2]) sticht die Zelle mit Hilfe des Mikromanipulators mit einer dünn ausgezogenen Kapillare an, die mit Clarkschen Indikatoren gefärbte Gelatine enthält.

Nach Leuthardt (s. oben) sind die Bestimmungen mit der Indikatormethode nichts anderes als Vitalfärbungen, und es fehlt die Möglichkeit, die Zahlen physikalisch-chemisch genau zu definieren. „Sie geben günstigenfalls die Richtung an (sauer oder alkalisch), sind aber zu einer quantitativen Auswertung nicht geeignet."

[1]) H. Pfeiffer, Eine Methode zur kolorimetrischen Bestimmung der Wasserstoffionen-Konzentration in pflanzlichen Gewebeschnitten ohne Anwendung von Moderatoren, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1925, XLII, S. 396.

[2]) T. Péterfi, Ein Beitrag zur Methode der p_H-Bestimmung in Zellen und Geweben, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1928, XLV, S. 56.

Die potentiometrische Bestimmung

Die potentiometrische Bestimmung beruht auf der Nernstschen Formel

$$E-E_0 = \vartheta \log \frac{1}{H} \text{ oder } p_H = \frac{E-E_0}{\vartheta}.$$

Taylor und Whitaker (Protoplasma, 1928, III, S. 1) führten Mikrowasserstoffelektroden direkt in die Zelle (von Nitella) ein. Da aber die Zellen meist für die Einführung von Wasserstoffelektroden zu klein sind, so hat man die Messungen meist mit Preßsäften ausgeführt. Man muß aber bei solchen Messungen in biologischen Flüssigkeiten immer damit rechnen, daß statt p_H ein Oxydations-Reduktionspotential gemessen wird (Taylor u. Whitaker, Leuthardt). Über andere Schwierigkeiten und Unsicherheiten siehe die oben erwähnte Arbeit von Leuthardt.

Oxydierende und reduzierende Wirkung

Die Festlegung oxydierender oder reduzierender Wirkung im Pflanzengewebe kann sich entweder auf den qualitativen Nachweis beschränken (analog dem Nachweis saurer oder alkalischer Reaktion) oder auf eine quantitative Charakterisierung erstrecken (analog der Bestimmung der Wasserstoffionen-Konzentration). Letztere findet ihren Ausdruck in der Bestimmung des Oxydations-Reduktions-Potentials.

Nachweis der oxydierenden und reduzierenden Wirkung

Systematische Studien über oxydierende und reduzierende Orte des Gewebes hat wohl zuerst Unna an tierischen Geweben angestellt. Er unterschied Sauerstofforte, die er mit Rongalitweiß (Leukomethylenblau) nachwies, von den Reduktionsorten, zu deren Nachweis er Kaliumpermanganat gebrauchte. Eine Kritik des Rongalitweiß-Verfahrens s. M. Gutstein, Über die Reduktionsorte und Sauerstofforte der Zelle, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1929, XLVI, S. 337. Loew benutzte auf pflanzlichem Gebiet die Reduktion von Malachitgrün zu Leukomalachitgrün. Längst bekannt ist die reduzierende Wirkung von Bakterien; Felton benutzte zu deren Nachweis die Reduktion des grünen p-Nitromalachitgrüns zu rotem p-Aminomalachitgrün, nachdem schon früher Methylenblau und Indigo benutzt worden waren.

H. Schneider[1]) hat zur Ermittlung der Reduktionsorte außer Permanganat die chemisch einwandfreiere Eisencyanmethode angewendet und festgestellt, daß das Reduktionsvermögen der Elemente

[1]) H. Schneider, Neue Studien zur Darstellung der Reduktions- und Sauerstofforte der Pflanze, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1914, XXXI, S. 478; hier eine Kritik der Unnaschen Methoden.

pflanzlicher Zellen in folgender Reihe zunimmt: Plasma, Kern, Kernkörperchen.

Für die Ausführung des Eisencyanverfahrens, des Nitrochrysophansäure- und Permanganatverfahrens haben Golodetz und Unna[1]) — zur Anwendung bei tierischer Haut — folgende Vorschriften gegeben:

I. Man hält sich je eine 1proz. Lösung von Ferrichlorid und Kaliumferricyanid in destilliertem Wasser vorrätig und mischt unmittelbar vor dem Gebrauch gleiche Teile dieser Lösungen in einem Schälchen. Nach Eintreten der Blaufärbung werden die Schnitte in Wasser abgespült und durch Weingeist und Öl in Balsam gebracht.

II. Die Schnitte kommen aus Alkohol in Chloroform, von da in die Lösung der Nitrochrysophansäure in Chloroform; nach zehn Minuten kommen sie über Chloroform in Öl und Balsam. Das Reduktionsprodukt der Nitrochrysophansäure ist violett gefärbt.

III. Die Schnitte kommen aus Wasser in eine Lösung von 1proz. Kaliumpermanganat und verbleiben darin nur kurze Zeit. Dann werden sie gut mit Wasser abgespült. Zu starke Braunfärbungen werden mit Oxalsäure oder einer Lösung von Kalziumbisulfit aufgehellt.

Über eine Kritik des Permanganatverfahrens s. M. Gutstein, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1929, XLVI, S. 337.

Zur Bestimmung der Reduzierbarkeit der basischen Farbstoffe benutzte Gutstein[2]) folgendes Verfahren: Zu je 1 ccm einer 20proz. Suspension von Hefe in physiologischer Kochsalzlösung wurden in Reagensgläsern steigende Mengen der Farbstoffe in einer Konzentration von 1 : 10000 hinzugesetzt. Die kleinste Farbstoffmenge — in Kubikzentimetern —, die die Hefe nach Absetzen in den geschüttelten Reagensgläsern deutlich anzufärben vermochte, wird als Reduktionsfaktor bezeichnet. Er ist um so größer, je stärker der Farbstoff von lebender Hefe reduziert wird. Reduktionsfaktoren $>$ 30 fand Gutstein für: Thiazine-Thionin, Toluidinblau, Methylengrün, Methylenblau NN, Methylenblau 2 B x, Oxazine-Neublau B, Neublau B, Nilblau, Nilblau 2x, Neumethylenblau GG, Naphtholblau. Neutralrot und seine Verwandten (Safranin, Rhodolinviolett) waren viel schwerer reduzierbar.

Die Methylenblau-Reaktion ist nach Harrison für die Messung von Reduktionssystemen in der Hefezelle unzuverlässig (Biochem. Journ., 1929, XXIII, S. 982; Chem. Zentralbl., 1930, I, S. 3315).

Watanabe[3]) weist oxydable Stoffe nach, indem er Schnitte einige Minuten mit destilliertem Wasser abspült, dann auf dem Objekt-

---

[1]) L. Golodetz u. P. G. Unna, Zur Chemie der Haut, 1909, XLVIII, S. 149.

[2]) M. Gutstein, l. c. und Zentralblatt f. Bakt., Abt. 1, Ref. XC, S. 426ff.

[3]) A. Watanabe, Über die vitale Oxydation der Pflanzenzellen mit den Kobaltamminkomplexsalzen, Jap. Journ. of bot., 1928, IV, S. 37; Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1928, XLV, S. 408 und Protoplasma, 1929, VII, S. 482.

träger in verdünnte Chloropentamminkobaltchlorid-Lösung bringt und die eintretenden Farbenänderungen beobachtet. Sitz der letzteren ist der Zellsaftraum; doch wurde auch Färbung der Mikrosome, bei Braunalgen die der Fukosanblasen, bei Foeniculum vulgare die des Kernes beobachtet; auch Harze und ätherische Öle werden gefärbt. Die Reaktion, bei der Ammoniak aus dem Komplex frei wird, erstreckt sich vor allem auf Phenolderivate und bewirkt eine sichtbare Gelb-Braunfärbung.

Bestimmung des Oxydations-Reduktionspotentials[1])

Die Grundlage der Bestimmung des Oxydations- und Reduktionspotentials ist folgender Gedankengang: „Kombiniert man ein Reduktionsmittel und ein Oxydationsmittel zu einer galvanischen Kette, so bildet das erstere den negativen, das letztere den positiven Pol. Ja, es läßt sich noch allgemeiner behaupten, daß in irgendeiner galvanischen Kette die am negativen Pol wirksame Substanz als Reduktionsmittel und die am positiven Pol wirksame Substanz als Oxydationsmittel fungiert. Das Potential ε_h, das nach obigem das Reduktionsbestreben einer Lösung zum Ausdruck bringt, nimmt für stark reduzierende Substanzen stark negative Werte an und ist dann als Reduktionspotential zu bezeichnen; für ausgesprochene Oxydationsmittel hingegen nimmt es stark positive Werte an und wird dann Oxydationspotential genannt. Es ist ersichtlich, daß zwischen einem Reduktions- und einem Oxydationspotential kein prinzipieller, sondern nur ein gradueller Unterschied besteht; diese Potentiale werden daher einfach R.-O.-Potentiale genannt" (Hirsch u. Rüter). Sie werden in der biologischen Literatur auch als Eh bezeichnet.

Die Bestimmung dieser Potentiale kann — wiederum ganz analog der Bestimmung von pH — entweder durch direkte Messung auf elektrischem Wege oder aber auf kolorimetrischem Wege erfolgen. Letzterer ist dadurch gegeben, daß zwischen dem Mischungsverhältnis von Farbstoff- und Leukoverbindung einerseits und dem R. O.-Potential andererseits eine gesetzmäßige Beziehung besteht. Da nun aber das Mischungsverhältnis von Farbstoff- und Leukoverbindung den kolorimetrisch bestimmbaren Grad der Farbintensität darstellt, so ist es möglich, durch Bestimmung dieser Farbintensität das Reduktions-Oxydationspotential einer Lösung zu bestimmen. Eine Komplikation erfahren die Bestimmungen dadurch, daß die Färbungen auch vom pH abhängig sind. Als Farbstoffe können u. a. Methylenblau und Lauthsches Violett verwendet werden. Clark führte die Indigosulfonate als Indikatoren für relativ starke Reduktionspotentiale ein, Derivate des Indophenols für schwächere. J. u. D. Needham benutzten das Natriumsalz des 1-Naphthol-2-sulfonsäure-Indophenols und spritzten seine Lösung mit Hilfe des Mikromanipulators Amöben ein.

---

[1]) Die grundlegenden Veröffentlichungen auf diesem Gebiet sind die von W. M. Clark (Veröffentlichungen seit 1920 im Journ. Wash. Acad. Sciences u. Public heath Reports); ferner P. Hirsch u. R. Rüter, Über Reduktions-Oxydations-Potentiale, Zeitschr. anal. Chem., 1926, LXVIII, S. 328, LXIX, S. 193, hier auch die Literaturangaben über die Veröffentlichungen von Clark.

Elektrometrie der Zelle

Jedem Punkte im Organismus kommt ein elektrisches Potential oder eine elektrische Feldstärke als primäres strukturbestimmendes und definierendes Element zu. Der Unterschied gegenüber der unbelebten Materie liegt nur darin, daß bei dieser die Potentiale und Felder konstant, bei jener von periodischen oder, besser gesagt, annähernd periodischen Schwankungen überlagert sind (R. Fürth)[1].

Man vergleicht entweder die Potentiale zweier Punkte des Organismus miteinander oder einen Punkt des Organismus mit irgendeinem geeigneten Stoff, z. B. Wasser.

Die Methodik der Elektrometrie der Zelle ist unter Benutzung des Mikromanipulators von Ettisch und Péterfi[2]) geschaffen worden. Pflanzenzellen mit Zellulosemembranen können in Gefrierschnitten den Elektroden zugänglich gemacht werden.

Siehe ferner E. Dejdar, Zur Technik der Herstellung von Mikroelektroden für die Elektrometrie von Zellen und Geweben, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1929, XLVI, S. 361; J. Gicklhorn, Die Herstellung von Mikroelektroden zur Potentialmessung, Kolloidchem. Beih., 1929, XXVIII, S. 245; R. Fürth, Physik in der Zelle, Physik. Zeitschr., 1929, XXX, S. 951; derselbe, Methoden zur Bestimmung der elektrischen Struktur kolloider Stoffe, insbesondere der Biokolloide, Abderhaldens Handbuch der biol. Arbeitsmethod., Abt. IIIB, S. 775 (Berlin und Wien 1929).

Gicklhorn und Umrath[3]) führten Messungen elektrischer Potentiale pflanzlicher Gewebe und einzelner Zellen durch. Sie fanden

das Mark negativ gegen Wasser,
das Phloëm negativ gegen Mark, somit auch gegen Wasser,
das Rindenparenchym wechselnd gegen Mark, jedoch negativ gegen Wasser,
das Xylem positiv gegen Mark und positiv gegen Wasser,
das Merenchym positiv gegen Mark und positiv gegen Wasser,
das Kollenchym positiv gegen Mark und schwach positiv gegen Wasser,

---

[1]) R. Fürth, Atomphysik und Elektrobiologie, Ergebnisse der Physiologie, 1928, XXVII, S. 864.

[2]) G. Ettisch u. T. Péterfi, Zur Methodik der Elektrometrie der Zelle, Pflügers Arch. f. d. gesamte Physiologie, 1925, CCVIII, S. 454.

[3]) J. Gicklhorn u. K. Umrath, Messung elektrischer Potentiale pflanzlicher Gewebe und einzelner Zellen, Protoplasma, 1928, IV, S. 228. — Weiteres, besonders über die Methodik s. K. Umrath, Potentialmessungen, Kolloidchem. Beihefte, 1929, XXVIII, S. 245; Elektrische Potentiale pflanzlicher Gewebe, Protoplasma, 1928, IV, S. 539; ferner C. T. Ingold u. J. Small, The hydrion concentration of plant tissues, Protoplasma, 1927/28, III, S. 458.

das Mesophyll des Blattes negativ gegen das Rindenparenchym eines Hauptnerven, ebenso gegen Wasser.

Die auf Wasser bezogenen Potentiale stimmen durchweg mit den auf Grund der Färbung erkannten „Anoden“ und „Kathoden“ im Sinne einer „Elektrohistiologie“ überein.

Das Protoplasma der Pollenschläuche und ebenso der Pollenkörner ist negativ gegenüber dem Außenmedium (10% Rohrzucker als Kulturflüssigkeit bei Zusatz von Narbenfragmenten).

Umrath[1]) führt zu diesem Thema noch folgendes aus: Die Parallelität zwischen Potentialen und Färbbarkeit gilt im allgemeinen nur für die Potentiale zwischen verschiedenen Geweben innerhalb eines Schnittes. „Handelt es sich aber um das Potential gegen Wasser, so geben nur bestimmte Elektroden, von den bisher untersuchten die Agarelektroden die der Färbbarkeit entsprechenden Potentiale. Nicht dagegen Platin- und Goldelektroden, welche Grundgewebe und Mark, je nach der Pflanzenart, statt einige Millivolt negativ, etwas bis stark positiv gegen Wasser erscheinen lassen.“ Bei Zellwänden, Kutikularbildungen und Strukturen überhaupt ist die Färbung der direkten Elektrometrie überlegen. Anders liegt es „in Fällen, in denen Potentiale von Zellen oder Vakuolen gemessen werden sollen, wo es sich um zwei wässerige Lösungen, z. B. Protoplasma und Außenmedium handelt und um eine diese trennende Grenzfläche mit einer elektrischen Doppelschicht, die den Potentialsprung bedingt.“

Lebendfällung

Fällungen in der lebenden Zelle (Lebendfällung, Aggregation) lassen sich, wie schon Ch. Darwin (Insektenfr. Pfl., 1876, S. 34, 58) mitteilte, durch stark verdünnte wässerige Lösungen von Alkaloiden und anderen basischen Substanzen hervorrufen (Alkalikarbonate, s. S. 382, besonders Ammoniumkarbonat, de Vries, Bot. Ztg., 1886, XLIV, 1. Ammoniumnitrat ist ungeeignet, Czapek, Lit. S. 259,3). Lebendfällung erfolgt auch bei der Plasmolyse (4% Rohrzucker, Salpeter, Chlorkalzium, W. Pfeffer, Lit. S. 715,2). Bei nachträglichem Wasserzusatz verschwindet mit der Plasmolyse auch die Fällung.

Loew und Bokorny[2]) studierten seit 1888 die Einwirkung basischer Verbindungen auf lebende Zellen und empfehlen in erster Linie Coffein

---

[1]) K. Umrath, Zell- und Gewebspotentiale, Kolloidchem. Beihefte, 1929 XXVIII, S. 259.

[2]) Th. Bokorny, Einwirk. bas. Stoffe auf d. leb. Plasma, Jahrb. f. wiss. Bot., 1888, XIX, 206; Üb. Aggregation, Jahrb. f. wiss. Bot., 1889, XX, 427. — O. Loew u. Th. Bokorny, Z. Chem. d. Proteosomen, Flora, 1892, LXXVI, 117. — Th. Bokorny, Zur Anatomie und Chemie einiger Drogen. Eiweißschläuche in denselben, Pharmaz. Ztg., 1929, LXXIV, S. 56; Zur Kenntnis des kolloiden Eiweißinhalts der lebenden Pflanzenzelle, Kolloid-Zeitschr., 1928, XLIV, S. 166. — O. Loew, Über die labile Eiweißmodifikation und die Silberreduktion in Pflanzen-

(und Antipyrin) in 0,1—1 proz. wässeriger Lösung. Es entstehen glänzende, rundliche Tröpfchen, die ineinanderfließen und sich (im Gegensatz zu der Alkalifällung) mehrere Tage unverändert halten. van Wisselingh (Lit. S. 382, 2) hat bei Algen eine 1proz. wässerige Antipyrinlösung benutzt, und nach Czapek lassen sich noch folgende Lösungen anwenden: Pyridinlösung (1 Mol: 8—100 Liter, myelinartige Tropfenniederschläge), Chinolinlösung (einige Tropfen Chinolin mit Wasser geschüttelt, wirkt ähnlich), Phenylhydrazinlösung (in 50proz. Weingeist gelöst, gelbbraune, amorphe, zackige Schollen), Chinin, Codein, Morphin und ihre Salze erzeugen dichte feintropfige Niederschläge.

Die Aggregation ist nach Bokorny eine Reaktion kolloidaler aktiver Proteinstoffe gegen Spuren von Basen (seltener von anderen Stoffen) oder sogar bloßen mechanischen Reizen, die im Wesen auf eine Wasserausstoßung aus der Substanz des gequollenen Körpers hinausläuft. Diese Niederschläge entstehen nur in unbeschädigten, lebenden Zellen. Die Reaktion gestattet somit eine Unterscheidung von lebendem und totem Plasma[1]). Die gefällten Tröpfchen wurden als **Proteosomen** bezeichnet. Ihre chemische Zusammensetzung ist trotz vieler Publikationen noch strittig.

van Wisselingh hielt das aktive Protein von Loew und Bokorny für Niederschläge der basischen Stoffe mit Tannin. In toten Zellen trete die Reaktion nicht ein, weil das Tannin verloren gehe.

Nach Loew und Bokorny[2]) soll Gerbstoff nicht vorliegen, da

zellen, Beih. z. bot. Centralbl., 1922, XXXIX, S. 124. — O. Loew u. Th. Bokorny, Über intravitale Fällungen, Flora, 1915, CVII, S. 111. — O. Loew, Zur Analogie zwischen lebender Materie und Proteosomen, Flora, 1916, CIX, S. 61; derselbe, Über die labile Eiweißmodifikation und die Silberreduktion in Pflanzenzellen, Beihefte z. bot. Centralbl., 1922, XXXIX, S. 124. — C. van Wisselingh, On intravital precipitates, Rec. trav. bot. neerl., XI, 1, S. 14, nach bot. Zentralbl., 1914, CXXVI, S. 589; Entgegnung, Flora, 1917, CIX, S. 357. — Th. Bokorny, Eiweißschläuche in einigen Pflanzen, besonders in landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, Bot. Arch., 1930, XXVIII, S. 57.

[1]) Hierzu hatten O. Loew und Th. Bokorny früher eine verdünnte alkalische Silberlösung benutzt, welche von lebendem, aber nicht von totem Plasma reduziert werden sollte. Dieser Nachweis wurde von verschiedenen Seiten abgelehnt (W. Pfeffer, Loew und Bokornys Silberred. in Pflanzenzell., Flora, 1889, LXXII, 46). Zur Unterscheidung von totem und lebendem Plasma dient Fuchsin. Totes Plasma speichert den Farbstoff begierig, lebendes nicht. Das Verfahren wird zur Unterscheidung von lebenden und toten Hefezellen benutzt; in einer 0,1proz. Fuchsinlösung erscheinen tote Hefezellen im mikroskopischen Bilde sofort stärker gefärbt als die Farblösung.

[2]) O. Loew u. Th. Bokorny, Aktives Eiweiß und Tannin in Pflanzenzellen, Flora, 1911, CII, S. 113.

gerbsaures Coffein, im Gegensatz zu den Proteosomen, sich sehr leicht in Ammoniak auflöst. Die Proteosomen koagulieren bei 50—56°, sowie durch verdünnte Säuren oder durch verdünnten Weingeist von 10—20 % und geben Eiweißreaktionen. Doch unterscheiden sie sich von dem gewöhnlichen Eiweiß dadurch, daß sie durch 0,1proz. Ammoniak in feste Kugeln umgewandelt werden, die bei Druck zerbrechen. Czapeks Ansicht von der Löslichkeit der Proteosomen in Weingeist soll auf Vortäuschung eines Lösungsvorganges durch starken Weingeist beruhen. Ihre Unlöslichkeit zeigt sich, wenn man die Objekte zuerst mit 20proz. Weingeist 3—4 Stunden behandelt, wobei sie koagulieren; nachher bleiben sie in starkem Weingeist ungelöst und unverändert. Auch verdünnte Essigsäure kann zur Koagulation benutzt werden. Die Präparate werden in 0,5proz. Coffeinlösung gelegt (Bildung von Proteosomen) und dann das betreffende Glasröhrchen („einige Minuten“ bei Spirogyren, 10 Minuten bei Flächenschnitten von Echeveria) in, auf 60° erhitztes Wasser gebracht. Die Proteosomen koagulieren nun. Oder die Algen kommen in 0,5proz. Coffeinlösung, dann in 8proz. Essigsäure, die mit 4 % Chlornatrium und 0,5 % Coffein versetzt ist. Diese „Lösung wirkt sehr rasch auf die Proteosomen koagulierend“. Gerbstoffe bleiben selbst nach mehrtägiger Coffeinbehandlung löslich, die Proteosomen werden fest (ähnlich wirkt Jod). Die Proteosomen können nur aus äußerst labilen Proteinstoffen bestehen. Hingegen macht Czapek geltend, daß sich die Coffeinfällung beim Einlegen der Präparate auf kurze Zeit in Azeton, Äthylalkohol, Methylalkohol auflöst und daß Myelinformen entstehen, die auf Fette hindeuten, zumal Fettfarbstoffe (Sudan III, Alkannin in Azeton gelöst) gespeichert werden. Doch sollen nach Czapek auch konzentrierte Tanninlösungen Myelinformen geben. Außerdem soll möglicherweise ein schleimiges, in Weingeist unlösliches Kohlenhydrat in Betracht kommen. P. Klemm (Flora, 1882, LXXV, 397 u. Lit. S. 393, 3), der in Übereinstimmung mit Klercker einen Eiweißgehalt verneint, gibt bei Azolla, Rosa, Quercus, Nymphaea u. a. Gerbstoffe und Fette an und, da er bei Crassulaceen Rotfärbung mit Vanillinsalzsäure erhielt, einen phloroglucidischen Stoff. Die Reaktion mit Vanillinsalzsäure kann aber auch auf Eiweißstoffe hinweisen (S. 671).

Die labile und stabile Form der Proteosomen lassen sich nach Loew[1]) — entsprechend den analogen Formen des Plasmas — durch ihr Verhalten gegenüber manchen Farbstoffen unterscheiden. Setzt man zu einer Coffeinlösung, in der sich Fäden von Spirogyra (am besten

[1]) O. Loew, Zur Analogie zwischen lebender Materie und Proteosomen, Flora, 1917, N. F. IX, S. 61.

majuscula) mehrere Tage befanden, einige Tropfen einer schwach gefärbten Lösung von Neutralrot und Methylenblau, so sind nach einem Tage alle labilen Proteosomen intensiv rot, die koagulierten Proteosomen in den abgestorbenen Zellen tief blau. Durch Chinon färbt sich die labile Form intensiv gelb, die stabile braun.

Plasmolyse[1])

Unter Plasmolyse versteht man die Kontraktion des lebenden Protoplasten unter dem Einfluß wasserentziehender Reagentien. Man benutzt vorteilhaft Lösungen neutraler Substanzen in einer Konzentration, daß das Leben des Protoplasmakörpers nicht leidet. (Wässerige Lösungen von Kalisalpeter [4 %, ebenso wirkt Chlorkalium bei Allium und Beta, W. Wächter, Jahrb. f. wiss. Bot., 1905, XLI, 165], Chlornatrium [5—10 %], Rohrzucker [10—15 %], Glyzerin, Kaliumazetat u. a.) Versuchsobjekte sind Algenfäden, die Epidermen von Stengeln, Blättern, Zwiebelschuppen und Trichome. Der Plasmaschlauch zieht sich von der Membran allmählich zurück und erscheint als geschlossener Sack, aber nicht immer als Kugel im Zellumen. Bei farbstofführenden Zellen tritt naturgemäß der Plasmaschlauch mit seinem farbigen Inhalt weit deutlicher hervor, da der Raum zwischen ihm und der Zellwand sich farblos abhebt. Aus diesem Grunde läßt man bei farblosen Objekten der Plasmolyse zuweilen eine Lebendfärbung (s. d.) vorangehen, oder aber man benutzt mit Eosin gefärbte plasmolysierende Flüssigkeiten; in letzterem Falle erscheint der plasmolysierte Plasmaschlauch ungefärbt und wird von einer gefärbten Zone umgeben. Für vergleichende Untersuchungen müssen Gewebestücke gewählt werden, deren Zellen gleich groß sind und gleichen Turgor besitzen (H. de Vries, Jahrb. f. wiss. Bot., 1883, XIV, S. 443).

Beim Ersatz der Reagentien durch Wasser wird die Plasmolyse aufgehoben, das Cytoplasma dehnt sich wieder bis zur Zellwand aus. Bisweilen lösen sich während der Kontraktion Stücke vom Plasmakörper ab. Sie werden beim Auswaschen wieder von dem sich erweitern-

[1]) Vgl. dazu F. Weber, Plasmolyse-Ort, Protoplasma, 1929, VII, S. 583 und Krampf-Plasmolyse bei Spirogyra, Pflügers Archiv, 1924, CCVI; Über die Beurteilung der Plasmaviskosität nach der Plasmolyseform (Untersuchungen an Spirogyra), Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1925, XLII, S. 146; Plasmolyse in verdünntem Gewebesaft, Protoplasma, 1929, VIII, S. 437.

Fr. Weber, Plasmolyse in verdünntem Gewebesaft. Protoplasma 1929, VIII, S. 437.

Über die Aufhebung eines negativen Plasmolyseorts durch Äther s. R. Behrisch, Ber. deutsch. bot. Ges. 1926, XLIV u. H. Scheitterer, Protoplasma 1930, X, S. 289.

den Plasmaschlauch aufgenommen. Bei schmalen und langen Zellen zerfällt der Plasmaleib oft in mehrere Teilstücke, die sich in einigen Fällen schwer oder gar nicht nach erfolgtem Zusatz von reinem Wasser wieder vereinen. Alsdann hat sich die Oberfläche des Protoplasten verändert, wahrscheinlich durch Bildung einer Art von Haptogenmembran (Haptogen wird das Häutchen genannt, das sich an der Oberfläche der Kolloide bildet.) Beim Rückgang der Plasmolyse in stark plasmolysierten Zellen (Allium cepa) durchbricht das Plasma zuweilen den kontrahierten Plasmaschlauch. Durch langes Liegen in plasmolysierenden Lösungen erfolgen in behäuteten Zellen (Helodea, Daucus, Allium) Kontraktionserscheinungen von Zellkern, Chromatophor und Körnerplasma[1]).

Bei Bakterien und Cyanophyceen findet nur selten eine vollständige Ablösung des Protoplasmas von der Membran statt[2]), da dem Plasma größere Safträume fehlen und wohl auch eine festere Verbindung zwischen Plasma und Membran besteht. Bei Cyanophyceen sind Lösungen stärkerer Konzentration erforderlich (bei Tolypothrix 20 % Salpeter). Hierbei erfolgt eine Verkürzung der Zellfäden um 25 %. Eine geeignete Flüssigkeit, die Bakterien plasmolysiert und gleichzeitig fixiert, ist eine mit Jod gesättigte 10proz. Chlornatriumlösung (A. Fischer, Plasmolyse d. Bakt., Sächs. Ak. Sitzgsber., 1890, S. 52). Die Plasmolyse läßt sich verfolgen, wenn man das Eintrocknen eines hängenden Tropfens unter dem Mikroskop beobachtet. Der zur Plasmolyse nötige Salzgehalt stammt aus den Nährböden der Kulturen. — Bei Spirogyren wird durch Vorbehandlung mit 0,03 bis 0,1proz. Sodalösung die Empfindlichkeit für Salpeter und Kochsalz stark vermindert; Vorbehandlung mit 0,1proz. Zitronensäurelösung verstärkt andererseits die schädigende Wirkung der Plasmolyse (Lepeschkin[3]). Im allgemeinen wird die Koagulation der Plasmamembran durch die saure Reaktion befördert und durch die alkalische gehindert. Bei einigen Meeresalgen wirken isosmotische Zuckerlösungen stärker als isosmotische Kochsalzlösungen (B. M. Duggar, Trans. Ak. St. Louis, 1906, XVI, 473). Bei Diatomeen hebt sich das Plasma meist an mehreren Stellen bogenförmig vom Kiele her ab (Benecke, Karsten).

Ein spontaner Rückgang der Plasmolyse erfolgt bei längerem Liegen der Objekte in den plasmolysierenden Flüssigkeiten und kommt durch Eindringen der Lösungen in den Protoplasten zustande. Bei Keimpflanzen (Vicia, Helianthus u. a.) erfolgt der Rückgang in Rohrzucker und Salpeter (A. Wieler, Ber. bot. Ges., 1886, V, 375), bei

[1]) E. Küster, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1909, XXVII, 597, Flora, 1910, C, 267 u.: Zeitschr. f. Bot., 1910, II, 689.

[2]) A. Fischer, Die Empfindlichkeit d. Bakterienzellen u. d. bakt. Serum, Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt., 1900, XXXV, 51 u.: F. Brand, Üb. d. osmot. Verh. d. Cyanophyceenzellen Ber. d. bot. Ges., 1903, XXI, 302.

[3]) W. Lepeschkin, Plasmamembr., Ber. d. bot. Ges., 1910, XXVIII, 393; Chem. Zusammens. d. Plasmamembr., Ber. d. bot. Ges., 1911, XXIX, 247.

Algen nach einigen Stunden auch in Chlornatrium (M. Janse, Bot. Zentralbl., XXXII, 21), bei Bakterien nach 1—2 Stunden in 2,5 % Salpeter, 1,25 % Chlornatrium oder Chlorammon und in 15 % Rohrzucker, in stärkeren Lösungen (5—10 % Salpeter) viel schneller (A. Fischer, Jahrb. wiss. Bot., 1894, XXVII, 1). Die Verhältnisse liegen recht verschieden. H. de Vries hat bei fünfstündiger Einwirkung von 7 % Salpeter, Neutralsalzen u. a. (Beta, Fragaria), Klebs bei Helodea, Moosen, Farnprothallien in Zuckerlösung keinen Rückgang beobachtet.

Während bei der Plasmolyse der gesamte Plasmaleib in seiner Lebensfähigkeit nicht gestört wird, kann man bei der sogenannten anormalen Plasmolyse den Plasmaleib soweit abtöten, daß nur der Tonoplast (die Vakuolenwand) und die von diesem umschlossene Vakuole am Leben bleibt. De Vries[1]) benutzte eine mit Eosin gefärbte 10proz. Kalisalpeterlösung (Spirogyren). Zunächst erfolgt normale Plasmolyse, so lange bleibt der gesamte Plasmaleib farblos. Nach zwei Stunden fangen die äußeren Schichten des Plasmas sich zu färben an, sie sterben ab, bald ist das ganze Plasma gefärbt, und nur die Zellsaftvakuolen erscheinen farblos, da der lebende Tonoplast die Lösung am Eindringen hindert. Die Vakuolen schnüren sich zuweilen ein (durch den Druck des abgestorbenen Plasmas), teils sind sie mehr oder weniger isoliert. In längeren Zellen kann die Einschnürung bis zur Teilung der Vakuolen fortschreiten; die Vakuolen können sich noch einige Tage am Leben halten. Went[2]) fixiert die Vakuolen mit ½—1 % Chromsäure (1—2 Tage), dann folgt Auswaschen in strömendem Wasser und Behandlung mit Weingeist (20—95 %, je 3—4 Stunden); aus dem fixierten Material werden in bekannter Weise Mikrotomschnitte hergestellt. Lidforss[3]) erhielt bei Potamogeton anormale Plasmolyse, wenn er die Schnitte zunächst mit einer nicht plasmolysierenden Sodalösung behandelte und dann erst 10 % Salpeter zufügte.

Die mit Neutralrot gefärbten Vakuolenkontraktion zeigenden Zellen von Elodea canadensis zeigen in plasmolysiertem Zustand dasselbe Bild, das Höfler[4]) als Kappenplasmolyse für Allium beschrieben hat.

Über die Erscheinungen, die bei Plasmolyse mit einer mit Kupfersulfat versetzten Kaliumnitratlösung oder mit Kupferazetatlösung auftreten, s. Gicklhorn, Kolloidchem. Beih., 1929, XXVIII, S. 377.

[1]) H. de Vries, Plasmolyt. Stud., Jahrb. f. wiss. Bot., 1886, XVI, 465.

[2]) F. A. F. C. Went, D. Vermehr. d. normal. Vakuol. d. Teil., Jahrb. f. wiss. Bot., 1888, XIX, 295.

[3]) B. Lidforss, Eigenartige Inhaltskörper bei Potamog. praelong., Bot. Zentralbl., 1898, LXXIV, S. 305.

[4]) Höfler, Über Kappenplasmolyse, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1928, XLVI.

Treten Plasmolyse und Deplasmolyse in Zellen ein, die man irgendwie — etwa mit Farbstoffen — vorbehandelt hatte, so schließt man daraus in der Regel, daß die Zellen lebendig sind. Schneider[1]) konnte indes zeigen, daß Zellen, die er durch hohe Temperaturen oder Einwirkung von Tannin getötet hatte, noch plasmolysierbar waren, und Bělăr[2]) beobachtete, daß Kerne der Staubfädenhaare von Tradescantia virginica, deren Zustand nach Behandlung der Zelle mit 3proz. Rohrzuckerlösung infolge der eingetretenen Entmischung als „hoffnungslos“ anzusehen war, durch kräftige Plasmolyse der Zellen wieder vollkommen normales Aussehen erlangten.

Andererseits sind auch eine Anzahl von Fällen bekannt, bei denen lebende Zellen nicht plasmolysierbar sind. Als „falsche Plasmolyse“ bezeichnete Osterhout die Erscheinung, daß sich das Protoplasma der Zellen mancher Meerespflanzen zusammenzieht, wenn sie aus Meerwasser in reines Wasser übertragen werden. Die Erscheinung kommt dadurch zustande, daß infolge plötzlicher Erhöhung der Permeabilität die osmotisch wirksamen Stoffe aus der Zelle austreten (Bot. Gaz., 1913, LV, S. 446).

Die Plasmolyse dient ferner zur Ermittelung des osmotischen Druckes (Pfeffer, Tröndle, Ber. d. bot. Ges., 1909, XXVII, 71 u. a.), zur Sichtbarmachung von im Zellsaft gelösten Stoffen (S. 329, 3, u. a.), zum Nachweis der Lokalisation (S. 183, 3) gewisser Inhaltskörper, bei der Feststellung von Membranveränderungen (Höhlke, Bot. Centr., Beih., 1901), bei der Schleimbildung, zur Isolierung der Protoplasten (J. af Klercker, 1892) und zum Nachweis zarter Plasmabeläge (Th. Lange, Flora, 1891, S. 393) in lebenden Elementen (Plasmolyse mit 5% Salpeter, Fixierung mit Pikrinsäure, Färbung).

Als Grundlage für Studien über die Permeabilität der normalen Zelle ist die Plasmolyse nach Hansteen-Cranner nicht geeignet, da infolge der durch das Plasmolyticum erfolgte Fällung der Lipoide der Zellwand in dieser offene Räume entstehen, durch die das Plasmolyticum ungehindert in die Zelle hineinströmt und dort durch Fällung der Lipoide der Grenzschichten Fällungsmembranen bildet, die im normalen Zustand nicht vorhanden sind.

Als **Plasmoptyse** bezeichnet A. Fischer (Ber. bot. Ges., 1906) den Austritt des Protoplasmas aus Bakterien, wobei bei geißeltragenden Bakterien die Membran intakt bleibt, bei geißellosen gesprengt wird. Nach A. Meyer handelt es sich um kuglige Anschwellung der ganzen Bakterienzellen (Ber. bot. Ges., 1906, XXIV, 208). Nach Schuster ist die Plasmoptyse eine Absterbeerscheinung (Ber. bot.

[1]) E. Schneider, Über die Plasmolyse als Kennzeichen lebender Zellen, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1925, XLII, S. 32.

[2]) K. Bělăr, Über die reversible Entmischung des lebenden Protoplasmas, Protoplasma, 1930, IX, S. 209.

Ges., 1910, XXVIII, 496). Bei Cyanophyceen (Brand) tritt das Plasma teils durch Zellsprengungen, teils „durch die Pori der Plasmodesmen" heraus, wenn auf die Fäden nach kurzer Einwirkung (½ Min.) von reinem Glyzerin schnell wieder Wasser zutritt.

Lebendfärbung

Die Aufnahme verschiedener Anilinfarben durch die lebende Zelle, die Lebendfärbung, wurde von Pfeffer (Lit. 716, 1) und gleichzeitig an tierischen Objekten mit den gleichen Farbstoffen von Ehrlich[1]) studiert. Da der gesamte Ein- und Austritt gelöster Substanzen in die lebende Zelle von der Plasmahaut abhängt und reguliert wird, so ist die Lebendfärbung von fundamentaler Bedeutung für die Erforschung der Plasmahaut, ihrer Permeabilität u. a.

Nach A. Meyer[2]) färbt sich lebendes Cytoplasma mit keinem Farbstoff; es seien vielmehr die im Cytoplasma liegenden ergastischen Gebilde, die die Farbstoffe speichern. Ist in den ergastischen Gebilden kein den Farbstoff speichernder Stoff enthalten, so tritt Färbung nicht ein. Auch ist zu berücksichtigen, ob die Färbung noch im normalen oder nur im erkrankten Zustand der Zelle beobachtet werden kann, da alle künstlichen organischen Farbstoffe mehr oder weniger Zellgifte sind. „In manchen Fällen färbt sich der Kern in der sicher noch lebenden Zelle. — Aber es ist nicht durch exakte Versuche entschieden, ob der Kern nur in der ‚kranken' Zelle oder auch in der ‚normalen' Zelle irgendeinen Farbstoff speichern kann."

Eine Speicherung im lebenden ungeschädigten Plasma (der Wurzelhaare von Hydrocharis morsus ranae) fand Schaede[3]) nur bei Chrysoidin. Eine Färbung des Kernes intra vitam wurde in keinem Falle gefunden.

Auch nach Gicklhorn und Keller[4]) lassen sich lebende Kerne nicht vital färben. Salkind[5]) schließt aus seinen Versuchen an tierischen Zellen, daß jede vitale Färbung auf eine Herabsetzung oder Zerstörung der Widerstandskraft der Zellen hindeutet.

[1]) P. Ehrlich, Über die Methylenreaktion der lebenden Nervensubstanz, D. med. Wchschr., 1886. Aus diesen Forschungen entwickelte sich die Farbentherapie, aus dieser wiederum die Chemotherapie, die großartige Erfolge in der Medizin zeitigte (P. Ehrlich, Aus Theorie u. Praxis d. Chemotherapie, Leipzig 1911).

[2]) A. Meyer, Morphologische und physiologische Analyse der Zelle usw., S. 473ff.

[3]) R. Schaede, Über das Verhalten von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarbstoffen, Jahrbücher f. wiss. Bot., 1923, LXII, S. 65.

[4]) J. Gicklhorn u. R. Keller, Über elektive Vitalfärbungen, Biochem. Zeitschr., 1924, CLIII, S. 1.

[5]) S. Salkind, Zur Frage über die Wechselbeziehungen zwischen Zellen und Vitalfarben, Protoplasma, 1929, VI, S. 321.

v. Möllendorff[1]) ist der Ansicht, daß ein großer Teil der Meinungsverschiedenheiten darauf zurückzuführen ist, daß verschiedene Forscher verschiedene Vorstellungen mit dem Begriff „vital" verbinden.

Eine sichere Entscheidung darüber, ob eine bestimmte Zelle nicht nachweisbar geschädigt oder „irreversibel destruiert" ist, bringt nach Gicklhorn[2]) Plasmolyse mit hypertonischen Lösungen von Kaliumnitrat oder Rohrzucker und nachfolgende Deplasmolyse bis zur Wiederherstellung des ursprünglichen Bildes (Vgl. aber S. 730).

Über die Bedingungen, unter welchen lebendes Protoplasma Farbstoffe aufnimmt s. W. Albach, Zellenphysiologische Untersuchungen über vitale Protoplasmafärbung. Protoplasma, 1928, V, S. 412.

Allmählich drang unter dem Einfluß von R. Keller und seiner Schule die Überzeugung durch, daß die elektrische Ladung der Farbstoffe von Bedeutung für das Problem der vitalen Färbung sei und daß man mit ihrer Hilfe die elektropositiven und negativen Orte der Gewebe und Zellen erkennen könne[3]).

„Werden Farbstoffe unter den Verhältnissen der lebenden Zellen, also unter vergleichsweise hoher Spannung und minimaler Stromstärke zur Wanderung im elektrischen Strom gebracht, so stimmen sie mit ihrem Verhalten in den pflanzlichen und tierischen elektrohistiologischen Testobjekten überein[4])" (Vgl. dazu auch S. 76).

Die Sicherheit dieses Schlusses ist aber durch eine Reihe von Momenten gefährdet, wie aus folgenden Äußerungen Kellers hervorgeht.

Die Hauptfehlerquelle bei der Verwendung der Vitalfärbung als elektroanalytischer Hilfsmethode besteht darin, daß es ziemlich leicht ist, elektronegativ geladene Korpuskeln von bestimmter kleiner Teilchengröße in lebende Zellen einzuführen, aber ungemein schwer, elektropositiv geladene Korpuskeln eindringen zu lassen. Die bisherige Vitalfärbung ist zu 99 % das, was wir Anodenfärbung nennen (Anfärbung des positiven Pols). Erst vom Jahre 1926 an ist es Gicklhorn gelungen, zuerst Pflanzenzellen, ohne sie zu sehr zu schädigen, an negativen Zellteilen anzufärben (Keller l. c.).

„Basische Farbstoffe können in der großen Verdünnung, in der sie wegen ihrer Giftigkeit angewendet werden müssen, von den entgegengesetzt geladenen negativen Kolloiden der Zelle adsorbiert und nunmehr an den entgegengesetzten Pol befördert

[1]) W. v. Möllendorff, Vitale Färbungen an tierischen Zellen, Ergebnisse der Physiologie, 1920, XVIII.

[2]) J. Gicklhorn, Über vitale Kern- und Plasmafärbung an Pflanzenzellen, Protoplasma, 1927, II, S. 1.

[3]) R. Keller, Kataphorese von Stoffen unter physiologischen Bedingungen, Biochem. Zeitschr., 1926, CLXVIII, S. 94.

[4]) Über ein Verfahren zur Bestimmung des Ladungssinnes der Farbstoffe, s. R. Fürth, Die elektrische Charakteristik der Lösungen, Farbstoffe und Biokolloide, Kolloidchem. Beihefte, 1929, XXVIII, S. 285.

werden, also an den positiven Pol, obgleich sie nach ihrer chemischen Konstitution selbst positiv sind." — „Die Aufsuchung von mikroskopischen Elektrizitätspolen durch ihre Speicherung von positiven und negativen Farbstoffen oder durch die Speicherung farbloser Moleküle, die später mit den entsprechenden chemischen Reagenzien sichtbar gemacht worden, ist eine Methode, die für sich allein nur mit großer Vorsicht gebraucht werden kann, weil viele Farbstoffe und Reagenzien auch in ganz schwacher Konzentration das Bild der lebenden Zelle verändern, weil die große Mehrzahl anderer Farbstoffe teils wegen ihrer erheblichen Teilchengröße, teils anscheinend aus nicht mechanischen Gründen nicht in das Innere des Plasmas eindringen. Untersucht man jedoch Schnitte lebenden Gewebes, so werden die elektrischen Potentiale der Zelle durch das Verletzen beeinflußt.

Die Färbung lebender Zellen hängt nicht nur von den Farbstoffen an sich ab, sondern von ihrem Lösungsmittel, von dem Aziditätsgrad der Lösung, von eventuellen kolloiden Beimischungen des Plasmas, der organischen Säfte usw., die die Farbstoffe adsorbieren, welche dann durch den Wanderungssinn des farblosen Adsorbens nach dem entgegengesetzten Pol dirigiert werden, kurz: die Fehlerquellen sind so zahlreich, daß eine Färbung allein noch keine entscheidende Bestimmung ergibt, so daß möglichst vielartige, voneinander unabhängige Färbungen durchgeführt werden müssen, soweit dies möglich ist, also beispielsweise molekulardisperse und kolloide Färbungen, Indikatoren auf Säure (+), Oxydationsreagentien (+), Reduktionsreagentien (—), starke und schwache Konzentrationen u. dgl. Kontrollen. In allen Fällen ist zu berücksichtigen, wie der betreffende Farbstoff unter den speziellen Verhältnissen des einzelnen Vorgangs geladen ist[1])."

Von Wichtigkeit auf den Ausfall mikroskopischer Lebendfärbungen ist das Coehnsche Dielektrizitäts-Ladungsgesetz: Stoffe mit höherer dielektrischer Konstante laden sich positiv gegen Stoffe mit niedrigerer dielektrischer Konstante. Ohne Kenntnis dieses Gesetzes und der einzelnen dielektrischen Konstanten lassen sich die mikroskopischen Färbungen nicht verstehen (Keller)[2]).

Über die Beziehungen zwischen Elektrizitätslehre und histologischer Technik s. H. Pfeiffer, Elektrizität und Eiweiße, insbesondere des Zellplasmas (Dresden und Leipzig, 1929, Th. Steinkopff).

Aus den ersten Versuchen ging hervor, daß nicht alle Farbstoffe zur Lebendfärbung geeignet sind. Ehrlich, der die Lebendfärbung auf chemische Ursachen zurückführte, hielt nur basische Farbstoffe für geeignet (Vitalfarben). Andererseits gelangte Overton (Lit. S. 345, 1) zu dem Ergebnis, daß sich Vitalfarben in Cholesterin und Lezithin leicht lösen (Lipoidlöslichkeit) und daß ganz allgemein ein Körper um so schneller in die Zellen eindringt, je mehr der Teilungskoeffizient

[1]) R. Keller, Elektrostatik als eigenes Arbeitsgebiet in der Biochemie, Kolloidchemische Beihefte, 1929, XXVIII, S. 219.

[2]) R. Keller, Elektroanalytische Untersuchungen, Arch. f. mikrosk. Anatomie, 1921, XCV, S. 117.

„Löslichkeit in Fett durch Löslichkeit in Wasser" zugunsten des Fettes liegt. So ergab sich die viel angefochtene Lehre von der Lipoidnatur der Plasmahaut.

Andererseits konnte Ruhland[1]) an größeren Versuchsreihen zeigen, daß die basischen Farbstoffe aufgenommen werden, die Säure-Farbstoffe, speziell die Sulfosäuren, im allgemeinen aber nicht. „Die Schnelligkeit der Aufnahme ist unabhängig vom Grade der Lipoidlöslichkeit. So werden z. B. das sehr schwer lipoidlösliche Malachitgrün und das Thionin mit großer Schnelligkeit, das sehr leicht lösliche Rhodamin ungemein langsam aufgenommen." Küster[2]) fand, daß fettunlösliche Stoffe leicht in die Zellen eintreten. Nach Szücs[3]) ist die Permeabilität der Plasmahaut nicht konstant. Die Aufnahme basischer Stoffe wird durch bestimmte Elektrolyten verzögert, so bei Gegenwart saurer Farbstoffe; dabei entstehen Farbstoffsalze, für die die Zellhäute impermeabel zu sein pflegen.

Zu den basischen Farbstoffen, die aufgenommen werden, zählen (nach Ruhland): Azofarbstoffe (Anilingelb, Chrysoidin, Bismarckbraun), Triphenylmethanfarbstoffe (Malachitgrün, Rosanilin und Pararosanilin nebst Salzen, Dahlia, Methylviolett, Methylgrün), Pyroninfarbstoffe (Rhodamin B), Oxazine (Nilblau, Prune pure), Thiazine (Gentianin, Methylenblau, Methylengrün, Thioninblau, Toluidinblau), Azine (Toluylenrot, Safranin, Nigrosin). „Vollviolett S", sagt Küster, „vermag vital in die Zellen von Ruta graveolens einzudringen; Chromgrün färbt die Zellen verschiedener Gewächse intra vitam. Mit den fluoreszierenden Pyroninfarbstoffen Eosin, Erythrosin und Echtsäurephoxin wurde an zahlreichen Pflanzen kräftige Vitalfärbung erzielt." Vollviolett S erscheint nach dem Eintritt an kleine Öltröpfchen gebunden. Indigkarmin färbt den Zellsaft nicht tiefblau, sondern nur zart blau oder fällt als Niederschlag aus. Bemerkenswert ist ferner, daß Säurefuchsin, Orange G, Naphthalingrün V u. a. eingetretene Farbstoffe durch Auswaschen in stehendem oder fließendem Wasser sich nicht mehr entfernen lassen.

Für die Versuche mit sauren Farbstoffen verwendete Ruhland[4]) meist junge Pflanzen von Vicia Faba, die mit der unteren Schnittfläche in die zu untersuchende, meist 0,05proz. Lösung hineingestellt

---

[1]) W. Ruhland, Permeab. d. Plasmahaut, Jahrb. wiss. Bot., 1909, XLVI, 1.

[2]) E. Küster, Über die Aufnahme von Anilinfarben in lebende Pflanzenzellen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1911, L, S. 261.

[3]) J. Szücs, Protoplasmapermeabilität, Anzeiger Wien. Ak., 1910, XVIII, S. 285.

[4]) W. Ruhland, Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut, Jahrbücher f. wiss. Bot., 1912, LI, S. 376.

wurden[1]). Zu den Versuchen über Aufnahme der basischen Farbstoffe wurden Schnitte durch die Epidermen der Zwiebelschuppen von Allium cepa und Spirogyren in die verdünnten Lösungen eingetragen.

Aus seinen Versuchen schließt Ruhland, daß die Aufnehmbarkeit von Farbstoffen durch die Pflanzenzelle nur von der Größe der Teilchen ihrer Sole abhängt. Es handle sich nicht um ein Löslichkeitsphänomen, sondern um einen Filtrationsprozeß, die Plasmahaut habe gegenüber diesen Stoffen die Funktion eines Ultrafilters.

An der Auffassung, daß die Aufnahme von Farbstoffen durch die Pflanzenzellen nur von der Größe der Teilchen ihrer Sole abhängt und daß es sich dabei nicht um ein Löslichkeitsphänomen, sondern um einen Filtrationsprozeß handle[2]), hielt Ruhland[3]) auch später fest. Liesegang[4]) befürwortete dann, statt Ultrafiltration Diffusion zu setzen.

Schulemann[5]) schließt aus seinen mit tierischen Zellen vorgenommenen Versuchen: Der Gesamtvorgang der Vitalfärbung setzt sich aus zwei sich überlagernden Hauptphasen zusammen:

1. Der Verteilung der Farbstoffe; 2. der Speicherung der Farbstoffe in den vitalfärbbaren Zellen.

Maßgebend für die Verteilung der Farbstoffe im Tierkörper ist das physikochemische Verhalten der Farbstofflösungen. Direkte Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Vitalfärbungsvermögen bestehen bei sauren Farbstoffen nicht.

In Übereinstimmung mit der Ruhlandschen Theorie finden Benoist, Golbin und Kopaczewski, daß pflanzliche Zellen von sauren Farbstoffen vital gefärbt werden, wenn die Dispersion des Farbstoffs sehr groß ist (Protoplasma, 1929, V, S. 481).

Geschwindigkeit und Ausgiebigkeit der Speicherung eines Vitalfarbstoffes darf nicht als Maß der Permeabilität des Protoplasten verwendet werden. Aus einer bestimmt lokalisierten Vitalfärbung darf nichts Sicheres über die Lokalisierung von elektrostatischen Ladungen gefolgert werden, da der Beweis fehlt, daß „jener Ort, an dem ein sichtbar gefärbtes Granulum liegt, ein Ort gegensätzlicher elektrostatischer Ladung zu der des Farbstoffes sein muß“ (Gicklhorn).

[1]) Die Methode ist zuerst von Goppelsroeder angewandt worden.

[2]) W. Ruhland, Die Plasmahaut als Ultrafilter bei der Kolloidaufnahme, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1912, XXX, S. 139.

[3]) W. Ruhland, Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut, Jahrb. f. wiss. Bot., 1912, LI, S. 376; weitere Beiträge zur Kolloidchemie und physikalischen Chemie der Zelle, ebenda 1914, LIV, S. 391.

[4]) R. E. Liesegang, Prinzipielle Bemerkungen über das Eindringen kolloider Farbstoffe in Pflanzenzellen, Biochem. Zeitschr., 1914, LVIII, S. 213.

[5]) W. Schulemann, Die vitale Färbung mit sauren Farbstoffen usw., Biochem. Zeitschr., 1917, LXXX, S. 1.

Im Gewebe wandern starke Säuren in der Regel zu den sauersten Punkten, Basen zu den alkalischen.

Die Erscheinung, daß konzentriertes Methylenblau im pflanzlichen Testobjekt die Kathode stärker tingiert, verdünntes die Anoden rein und elektiv färbt, hängt damit zusammen, daß bei konzentrierten Lösungen die genügende Zahl von Plasmakolloidkorpuskeln zur Adsorption fehlt; der größte Teil des Methylenblaus befinde sich in der Phase des reinen Wassers und wandert als schwach basisches Radikal zur Kathode.

In einer typischen Pflanzenzelle kommt es nach Gicklhorn nicht zur Granulabildung im Protoplasma, weil die Pflanzenzelle in den Safträumen bereits über eine Depotstelle verfügt mit Stoffen, welche den Farbstoff binden können[1]).

Von allgemeinem Interesse sind die Ergebnisse, die von Pekarek[2]) bei Versuchen über vitale Färbung an Nektarien gewonnen wurden: Lediglich die im biologischen Milieu negativierten Farbstoffe werden in den Drüsenzellen und nur in diesen gespeichert. Das Speicherungsvermögen für die verschiedenen basischen Farbstoffe ist verschieden. Saure Farbstoffe werden in den Drüsenzellen der Nektarien nicht gespeichert, auch nicht — nach den bisherigen Untersuchungen — die leicht umladbaren und die Indikatorfarbstoffe. Die Speicherungsintensität ist abhängig vom Alter bzw. von der Funktionstüchtigkeit der Drüsenorgane. Gleichsinnig tätige Zellen ergeben gleiche oder ähnliche elektive Färbungen dann, wenn eine jeweilige Funktion genügend spezialisiert ist.

Zur Lebendfärbung (Methode S. 383) dienten als Versuchsobjekte zunächst Algen, Epidermen von Allium cepa, submerse Wurzeln von auf Wasser schwimmenden Pflanzen (Azolla, Lemna, Trianea bogot.). Zuerst wurden Methylenblau und Toluylenrot (Neutralrot) studiert. Pfeffer ließ Pflanzen einige Tage in einer Lösung von 1 Teil Methylenblau in 10 Millionen Teilen Wasser. Hierbei werden die Gerbstoffe gefällt. Methylenblau kann ohne Schädigung der Zellen durch 0,01 % Zitronensäure wieder entfernt werden.

Zur Ausführung von Vitalfärbungen läßt man nach Küster entweder Sproßstücke, Blätter usw. mit der Schnittfläche in die Indikatorlösung tauchen und den Farbstoff in den Leitungsbahnen automatisch aufsteigen und aus diesen in die lebenden Zellen eindringen oder man läßt ein Pflanzenorgan oder Teile eines solchen völlig in der Farblösung untertauchen.

Zu Versuchen letzterer Art tauchte Küster[3]) Zwiebeln in Lösungen

[1]) J. Gicklhorn, Beobachtungen über die vitale Farbstoffspeicherung, Kolloidchem. Beihefte, 1929, XXVIII, S. 367.

[2]) J. Pekarek, Vitalfärbungen von Nektarien, Kolloidchem. Beihefte, 1929, XXVIII, S. 353; derselbe, die Vitalfärbung als allgemeine botanische Untersuchungsmethode, ebenda, S. 280.

[3]) E. Küster, Über Vitalfärbung von Pflanzenzellen mit Phthaleinen, Ber.

des Farbstoffs unter, nachdem er ihnen mit einer Nadel Stichwunden beigebracht hatte.

Für beide Arten der Vitalfärbung fand Küster geeignet: Tetrabromphenolsulfophthalein (Bromphenolblau) und Phenolsulfophthalein (Phenolrot). Gefärbt wird der Zellsaft.

Guilliermond[1]) kultivierte Saprolegnia auf mit Vitalfarbstoffen gefärbten Medien. Geeignet erwiesen sich Neutralrot (bis 0,4 %) und Toluidinblau. Die Vakuolen beladen sich sehr stark mit Farbstoff.

Eine dritte Art der Vitalfärbung ist die von Schnitten.

Zur Lebendfärbung von Schnitten benutzt Schaede[2]) eine Lösung von 0,002 % Chrysoidin (1 : 50000), der so viel Rohrzucker zugesetzt wird, daß sie für den jeweiligen Gegenstand isotonisch ist. Für Schnitte durch die Wurzelspitze von Allium cepa bei Wasserkultur war 2 % Rohrzucker am günstigsten, für die von Vicia faba aus Kultur in Sägespänen 3 %. Wichtig ist die Beschaffenheit des Wassers. Es darf nur solches verwendet werden, das aus Glas in Glas — am besten Jenaer — destilliert und in sorgfältigst gereinigten Kolben aus Jenaer Glas aufbewahrt wird. Die Gefäße für die fertigen Lösungen sind vor Gebrauch mit destilliertem Wasser auszukochen.

Die Färbung wird in kleinen, mit etwa 5 ccm Chrysoidinzuckerlösung beschickten Uhrgläsern vorgenommen. Nach etwa 8 Minuten wird das Präparat mit einem Tropfen derselben Lösung als Einschlußmittel hergestellt. Verdunstende Flüssigkeit ist durch die gleiche Lösung zu ersetzen.

Die Beobachtung der lebend gefärbten Schnitte soll nicht über eine Stunde ausgedehnt werden.

Aus der riesigen Literatur über Vitalfärbung sei noch das Folgende angegeben:

Hecht[3]) hat zuerst plasmolysiert und dann mit verdünnter Eosinlösung Plasma vital gefärbt, anscheinend ohne es erkannt zu haben.

Um Farbstofflösungen von der Schnittfläche abgeschnittener Blatt- oder Sproßstücke aus in die Höhe steigen zu lassen verwendete Küster[4])

d. Oberhess. Ges. f. Nat. u. Heilkunde zu Gießen, N. F., Naturw. Abt. 1926/1927, XI, S. 8.

[1]) A. Guilliermond, Sur le dévéloppement d'un Saprolegnia dans des milieux additionés de colorants vitaux et la coloration du vacuome pendant la croissance, Compt. rend. Acad. sciences, 1929, CLXXXVIII, S. 1621.

[2]) R. Schaede, Untersuchungen über Zelle, Kern und ihre Teilung am lebenden Objekt, Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1920—1926, XIV, S. 231.

[3]) K. Hecht, Studien über den Vorgang der Plasmolyse, Cohns Beiträge zur Biologie der Pflanze, 1912, XI.

[4]) E. Küster, Über Vitalfärbung der Pflanzenzellen II, III, IV, Zeitschr. wiss. Mikroskop., 1921, XXXVIII, S. 280, I, ebenda 1918, XXXV, S. 95.

besonders 0,1proz. Lösungen von Fuchsin S. Außerdem Lichtgrün F S, Orange G, Acetylrot G H, Chrom echtblau B, Saturngelb G, Tartrazin E H, Brillantpalatinrot.

Sehr wirkungsvolle Färbung der Gefäße erzielte er mit Oxaminbrillantgrün, Neptunbraun R X, Palatinchrombraun 2 G H und namentlich mit Säureviolett C_2B und Oxaminlichtblau.

Von den Einzelergebnissen ist erwähnenswert, daß sich die Vitalfärbung als geeignetes Mittel zum Nachweis der Gefäßprimanen erwies.

Klebs[1]) benutzte zur Vitalfärbung der Farnprothallien Gallein in 0,1proz. Lösung, Alizarinrot (0,01proz., färbt infolge der sauren Reaktion des Zellsaftes gelb), Echtbraun G. und O (0,1proz., schon giftig), Tropaeolin OO (nach 14 Tagen Zellsaft gefärbt).

Sämtliche basische Farbstoffe wirken für Farnprothallien giftig.

Paltauf[2]) verwendete zur Lebendfärbung von Zellkernen besonders Erythrosin und Eosin (1 : 10 000) und Dahliaviolett (1 : 50 000). Durch Zusatz von Magnesiumnitrat, Kalium-, Natrium- und Kalziumnitrat, sowie Aluminiumsulfat zur Farbstofflösung wird die vitale Kernfärbung stark begünstigt; auch durch Alkohol und Äther tritt vitale Kernfärbung zahlreicher auf; erhöhte Temperatur hat einen günstigen Einfluß auf die vitale Kernfärbung. Die Farbstoffspeicherung ist wahrscheinlich durch eine schwache Schädigung des Zellkerns bedingt.

Ein Gemisch von Methylenblau und Neutralrot, das nach Bučizka die lebenden Teile des Protoplasmas rot und die leblosen Teile blau färben soll, färbte nach Versuchen von Lepeschkin[3]) bei Bryopsis nur mehrere Granula des Protoplasmas rot, kleinere Körnchen und die Grundmasse erschienen farblos. Koagulierte aber das Protoplasma infolge einer mechanischen Einwirkung, so färbten sich die Granula und die koagulierte Grundmasse des Protoplasmas violett. Bei zunehmender Koagulation des letzteren wurde die violette Färbung immer mehr bläulich, bis sich zuletzt alles blau färbte.

Elektrolyte beeinflussen die Aufnahme von Eosin und Erythrosin durch lebendes Protoplasma und lebende Zellkerne um so mehr, je kleiner das p_h der Lösung ist; an der starken Wirkung der Aluminiumsalze ist außer ihrem p_h das Kation in spezifischer Weise beteiligt. Die Reaktion

[1]) G. Klebs, Über das Verhalten der Farnprothallien gegenüber Anilinfarben, Sitzgsber. Heidelb. Akad. Wiss. Math. naturw. Kl., Abt. B, 1919, Abhandlg. 18.

[2]) A. Paltauf, Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss. Math. naturw. Kl., Abt. I, 1928, CXXXVII, S. 691.

[3]) W. W. Lepeschkin, Über das Protoplasma und die Chloroplasten von Bryopsis plumosa, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1926, XLIV, S. 14.

der Zelle beeinflußt die Geschwindigkeit der Färbung, nicht die Menge des aufgenommenen Farbstoffs[1]).

Während nach den Angaben zahlreicher Beobachter die Mitochondrien der tierischen Zellen mit Dahliaviolett, Methylviolett 5 B und Janusgrün Höchst vital gefärbt werden können, ist dies nach den Erfahrungen von Guilliermond[2]) bei den Mitochondrien der pflanzlichen Zellen nur mehr oder minder schwierig möglich und nur nach mehr oder minder langer Zeit; außerdem verändern sie sich dadurch sehr rasch (Bläschenbildung) und sterben bald ab. Außerdem sind die genannten Farbstoffe nicht für die Mitochondrien spezifisch, sondern färben auch, wenn auch in stärkerer Konzentration, die Kolloide der Vakuolen.

Zur Vitalfärbung des Vakuoms (s. S. 714) ist Neutralrot am geeignetsten, das sonst nur noch freie Fettsäuren, so die der Rizinussamen färbt. Außerdem eignen sich Kresolblau, Toluidinblau, Methylenblau und Nilblau.

Eine über 0,02proz. Lösung des Neutralrots wirkt giftig; die Vakuole entfärbt und kontrahiert sich, während das Cytoplasma eine dunkelrote Färbung annimmt. Analog verhalten sich die anderen genannten Farbstoffe. Sie sind aber weniger geeignet als das Neutralrot, weil sie schwerer in die Zellen eindringen und giftiger sind. Dies gilt besonders für Kresol- und Nilblau.

Die Chloroplasten der Blätter von Elodea canadensis lassen sich mit Neutralrot (1 : 1000 u. 1:10000) färben. Sie nehmen 1—2 Tage vor dem Absterben der Zellen eine braune Mischfarbe —infolge ihrer ursprünglich rein grünen Färbung —an, die immer dunkler wird und mehr ins Rötliche übergeht. Doch sind nicht alle Chloroplasten desselben Plasmaballens gleich intensiv gefärbt; es kann sogar vorkommen, daß einzelne Chloroplasten schon ziemlich intensiv braun gefärbt sind, während die Mehrzahl noch rein grün ist.

Diese Färbung der Chloroplasten tritt zwar in der noch lebenden Zelle ein, ist aber als Krankheitssymptom zu deuten (Weber)[3]).

Färbungen des Zellsaftes lebender Zellen konnte Schaede[4]) ausführen u. a. mit Prune pure (1 : 100 000 destilliertes oder abgestandenes

[1]) W. Albach, Zellenphysiologische Untersuchungen über vitale Protoplasmafärbung, Protoplasma, 1928, V, S. 412.

[2]) A. Guilliermond, Le vacuome des cellules végétales, Protoplasma, 1930, IX, S. 133, insbes. S. 148.

[3]) F. Weber, Vakuolen-Kontraktion vital gefärbter Elodea-Zellen, Protoplasma, 1930, IX, S. 106.

[4]) R. Schaede, Über das Verhalten von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarbstoffen, Jahrb. wiss. Bot., 1923, LXII, S. 65, u. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 1924, XLI, S. 345.

Leitungswasser), Brillantkresylblau (1 : 1 000 000 destilliertes Wasser und Leitungswasser, mit letzterem auch 1 : 500 000), Neumethylenblau (1 : 1 000 000 destilliertes Wasser).

Siphoneen, namentlich Caulerpa, lassen sich mit vielen Farben intravital färben. Von Chrysoidin ist eine 0,0025proz. Lösung am besten, von Neutralrot wurde noch eine 0,01proz. Lösung vertragen. Die Färbungen verschwinden in reinem Wasser bisweilen schon nach 12 bis 24 Stunden, spätestens nach 2—3 Tagen (Dostál)[1].

Zur Lebendfärbung von Grünalgenanflügen verwendete Brand[2]) eine 1proz. Lösung von Kongorot, eine ½proz. Lösung von Brillant- und Methylenblau und eine ¼proz. Lösung von Neutralrot. Bemerkenswert ist der Unterschied in der Membranfärbung lebender und toter Zellen. Die Membranen von lebendem Pleurococcus vulg. Menegh. u. a. sind gegen Kongorot ziemlich resistent, werden aber an leeren Zellen gefärbt; an Pseudoendoclonium färbt sich die lebende Membran mit Brillantblau, nicht die längere Zeit abgestorbener Zellen; durch 20proz. Essigsäure wird bei den meisten Formen die Färbung des Inhalts und der Membran vollständig oder größtenteils aufgehoben, wenn mit Brillantblau gefärbt war; bei Pseudoendoclonium wird sie in lebhaftes Wein- bis Purpurrot umgewandelt.

Matruchot[3]) erzielte in sehr origineller Weise dadurch Vitalfärbung, daß er geeignete Pigmentbakterien, die ihren Farbstoff an das Kulturmedium abgeben, zusammen mit Pilzen kultivierte.

Vitalfärbungen durch basische Farbstoffe (Brillantkresylblau, Neutralrot, Methylenblau, Bismarckbraun u. a.) lassen sich mit Sublimat, die durch Phenolfarbstoffe (Pigmentbraun, Benzolazonaphthol) teilweise durch Bleiazetat konservieren.

Prinzipiell ist jede Vitalfärbung fixierbar, sobald das gewählte Fixationsmittel mit dem Farbstoff eine möglichst schwer lösliche Verbindung erzeugt.

Die Farbstoffaufnahme bei der Vitalfärbung (und damit wohl der Färbung überhaupt) beruht auf Adsorption[4]).

[1]) R. Dostál, Zur Vitalfärbung und Morphogenese der Meeressiphoneen, Protoplasma, 1928, V, S. 168.

[2]) F. Brand, Analyse der aerophilen Grünalgenanflüge, insbesondere der proto-pleurococcoiden Formen, Arch. f. Protistenkunde, 1925, LII, S. 265.

[3]) L. Matruchot, Sur une méthode de coloration du protoplasma par les pigments bactériens, Compt. rend. Acad. sciences, Paris, 1898, CXXVII, Nr. 22.

[4]) S. Skraup, Über Vitalfärbung mit einfachsten Farbstoffen und ihre Fixierung, Sitzgsber. physik. med. Ges., Würzburg, 1917, S. 9; Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk. 1917, XXXIV, S. 343; auch Ber. Deutsch. chem. Ges., 1916, XLIX, S. 2142.

Klebs[1]) beobachtete, daß beim Einbringen von Prothallien in eine Lösung von Kongorot die Rhizoidenzellwand den Farbstoff sofort begierig aufnimmt, während die Wandung der Prothallienzellen im lebenden Zustand nicht gefärbt wird. Die Zellhaut der toten Zellen nimmt dagegen den Farbstoff begierig auf.

Verwiesen sei noch auf: J. Gicklhorn, Kristalline Farbstoffspeicherung im Protoplasma und Zellsaft pflanzlicher Zellen nach vitaler Färbung, Protoplasma 1929, VII, S. 341.

Der Zellkern

Zellkerne finden sich jedenfalls in den Zellen aller Pflanzen, nur bei den Cyanophyceen ist das Vorhandensein echter Zellkerne bis in die neueste Zeit strittig. Der Zellkern gehört zu den spezifisch schwersten Bestandteilen der Zelle (Lit. S. 25,1). Beim Zentrifugieren werden die Nukleolen herausgeschleudert und gelangen mit den Kernen an das zentrifugale Ende der Zellen. In jugendlichen Zellen ist der Zellkern gewöhnlich rund, scheibenförmig, in älteren Zellen nimmt er langgestreckte Formen an, erscheint stab- oder spindelförmig gestreckt, im Samen zuweilen von unregelmäßiger Gestalt. Er kann in den Schließzellen der Spaltöffnungen je nach dem Öffnungszustand des Spaltes verschiedene Form annehmen (F. Weber). Die Größe der Zellkerne schwankt bedeutend. Bei den Pilzen sind sie oft nur 1—2 μ groß, bei Bakterien nur 0,3 μ groß, bei den Dikotylen 5—10 μ. Ranunculaceen, Nymphaeaceen, Loranthaceen, Monokotylen führen größere Kerne (30—50 μ), die langgestreckten Kerne (Fadenkerne) in den Sekretbehältern von Aloe werden 80 : 40 μ groß, im Schleim von Lycoris radiata bis 1,5 mm lang. Im allgemeinen findet sich in jeder Zelle nur ein Kern, doch kommen in langgestreckten Elementen (Bastformen, Milchröhren) auch mehrere bis zahlreiche Kerne vor. Bei endgültiger Ausbildung der Zellen lösen sich die Kerne meist auf. „Bei den Entwicklungs- und Gestaltungsvorgängen der Zelle" (Haberlandt) kommt ihnen eine große Bedeutung zu. Auch als Träger der Vererbungssubstanz werden die Zellkerne angesprochen.

Man sieht an gefärbten Objekten, daß der ruhende Kern aus einem zarten Gerüstwerk eines nicht färbbaren Fadens besteht, dessen Substanz als Linin bezeichnet wird. In dem Faden liegen stark färbbare Körnchen, die man als Chromatin bezeichnet[2]). Zwischen den Windungen des Lininfadens liegen 1—3 Kernkörperchen, Nukleolen, die den am stärksten färbbaren Teil des Zellkernes bilden,

[1]) S. Klebs, Über das Verhalten der Farnprothallien gegenüber Anilinfarben, Sitzgsber. Heidelb. Akad. Wissensch. Math. naturw. Kl., Abt. B, 1919, X, Abhandlg. 18.

[2]) Über eine etwaige chemische Verschiedenheit von Linin und Chromatin herrscht trotz des verschiedenen Verhaltens gegen Färbemittel keine Klarheit. Lundegårdh und viele andere halten die gesamte Gerüstsubstanz für einheitlich („Karyotin").

(H. Lundegårdh, Fixierung, Färbung und Nomenklatur der Kernstrukturen, Arch. mikrosk. Anatom., 1912, LXXX, S. 223.)

sich anders als die Chromatinkörnchen färben und schon an ungefärbten Kernen ohne weiteres als stark lichtbrechende Gebilde hervortreten.

Das Gerüstwerk des Kernes findet sich in der mit einer homogenen Flüssigkeit, dem Kernsaft, erfüllten Kernhöhle, die von einer körnchenfreien Schicht, der Kernwand, umhüllt wird. Nach Strasburgers Ansicht ist die Kernwand kinoplasmatischer Natur.

Nach Němec[1]) besitzen die von ihm untersuchten Ruhekerne eine elastische Membran, an die ein zähes *reticulum* mit Chromatinanhäufungen anstößt. Im *reticulum*, dessen Maschen mit flüssigem Kernsaft erfüllt sind, ist der flüssige *nucleolus* aufgehängt.

Die Zellkerne in der Wurzelspitze von Allium cepa sind in lebendem Zustand homogen und durchscheinend; eine Struktur ist nicht zu erkennen (Schaede)[2]).

Der letzte Satz berührt bereits die viel erörterte Frage, ob die im Schrifttum beschriebenen Kernstrukturen Kunstprodukte sind oder nicht.

Daß man mit den üblichen Methoden vielfach Kunstprodukte erhält, hat A. Fischer[3]) gezeigt. Pepton, Hämoglobin, Casein, Conglutin u. a. wurden mit den gebräuchlichsten Fixierungsmitteln behandelt und zeigten schöne Granulabildung. Holundermark wurde mit 2—10proz. Peptonlösung injiziert, mit 1proz. Osmiumsäure, Altmanns Mischung fixiert, gefärbt und geschnitten. Die Präparate ließen Zellkerne, Mikrosomen, Granula u. a. erkennen. Des weiteren lassen sich mit einer Albumoselösung je nach ihrer Konzentration und mit ein und derselben Fixierungsflüssigkeit verschieden gestaltete Fällungen erzielen, die mit Farbengemischen verschiedene Färbungen annehmen. Eine wässerige 3proz. Albumoselösung wird durch Platinosmiumessigsäure in großen Granulis ausgefällt, eine $^1/_{10}$proz. Lösung als winzige Körnchen. Mischt man beide Fällungen und färbt das Gemisch mit Flemmings Safranin-Gentiana, dann werden die großen Fällungen rot, die kleinen violett gefärbt.

Der lebende ruhende Kern befindet sich im Solzustande und zeigt, falls er überhaupt eine Struktur erkennen läßt, nur tropfige oder körnige Einschlüsse. Die netzigen oder wabigen Strukturen der toten, besonders der fixierten Ruhekerne sind durch die Fixierung erzeugte Kunstprodukte (Lepeschkin[4]),

[1]) B. Němec, Über Struktur und Aggregatzustand des Zellkernes, Protoplasma, 1929, VII, S. 423.

[2]) R. Schaede, Untersuchungen über Zelle, Kern und ihre Teilung am lebenden Objekt, Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1920—1926, XIV, S. 231.

[3]) A. Fischer, Zur Kritik der Fixierungsmethoden aus der Granula, Anat. Anz., 1894, IX, S. 678 u. Cyanophyc. u. Bakt., Jena 1897.

[4]) W. W. Lepeschkin, Kolloidchemie des Protoplasmas, Berlin 1924.

Schaede)[1], da auch die besten Fixierungsmittel ein Sol immer in ein Gel überführen (Tischler). Ausnahmsweise mögen Ruhekerne vorkommen, die lebend bereits im Solzustand sind. In diesen kann das Karyotin, das auch im fixierten Material erkennbare Maschenwerk bilden (Schaede). Das Sol des Kerns besteht aus dem Kernsaft als Dispersionsmittel und dem Karyotin als Dispersum.

In gesunden Meristemzellen lebender Wurzelspitzen von Allium cepa und Hyacinthus romanus sind weder Kernstrukturen noch Karyokinesen zu sehen. Strukturen, die nach Eintragen der Zellen in nicht indifferenten Medien gesehen werden, können von diesen hervorgerufen sein. Nur Osmiumsäuredämpfe erhalten den Zytoplasten befriedigend. Fixierungsmittel — in ihrer Wirkung abhängig vom Fixiermittel und der Reaktion des Zellsafts — verwandeln das Plasma teils in ein Spumoid, teils in Gerinnsel, die sich zu einem Raumgitter zusammenfügen; der lebende Kern ist ein Sol mit im Kernsaft dispergierten Karyotintröpfchen (in besonderen Fällen ein Gel).

Chromocentren können Kunstprodukte sein, ebenso sind es die Höfe um die Nukleolen. Spiralige Strukturen in Kernfaden und Chromosomen werden von einigen Fixierungsmitteln vorgetäuscht (Schaede)[2].

An mit Erythrosin vital gefärbten Zellkernen der Epidermiszellen von Allium cepa beobachtete Gicklhorn folgendes: Der hyalin bleibende Kern ist ohne jede Änderung seiner Größe intensiv und homogen leuchtend rot gefärbt. Die scharfe Abgrenzung gegen das Plasma zeigt deutlich das Bestehen einer Kernwand. Ein in fixierten Präparaten oft recht auffälliger „Kernhof" fehlt. Die Nukleole — meist zwei — haben eine nur wenig vertiefte Färbung im Vergleich zum Kernkörper.

Der Zellkern ist ein Komplex wasserarmer Hydrosole (Gaidukov). Der Ruhekern befindet sich im Solzustand. Das Sichtbarwerden von Strukturen ist die Folge der im Tode auftretenden Gelbildung. Die Bildung der Chromosomen ist ein kolloidaler Entmischungsvorgang (Schaede)[3].

Die neueren Auffassungen über die Struktur des ruhenden Kerns gehen im allgemeinen dahin, daß dieser ein Sol ist und daß das Karyotin in Tröpfchen in der Karyolymphe dispergiert ist.

Vgl. dazu R. Schaede, Die Kolloidchemie des pflanzlichen Zellkerns in der Ruhe und in der Teilung, Ergebnisse der Biologie, 1929, V; S. Strugger, Beitrag zur Kolloidchemie des pflanzlichen Ruhekerns, Protoplasma, 1929, X.

Der sichtbare Zustand der Chromosomen ist durch die H-Ionenkonzentration des Mediums bedingt (Kuwada u. Mitarbeiter)[4].

[1]) R. Schaede, Über die Struktur des Ruhekerns, Ber. deutsch. bot. Ges., 1926, XLIV, S. 298.

[2]) R. Schaede, Vergleichende Untersuchungen über Cytoplasma, Kern und Kernteilung im lebenden und im fixierten Zustand, Protoplasma, 1927/1928, III, S. 145.

[3]) R. Schaede, Über die Struktur des Ruhekerns, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1926, XLIV, S. 298.

[4]) Kuwada, Yoshinari and Sakamura Tetsu, Protoplasma, 1926, I, S. 239.

Åkerman[1]) konnte weder in lebenden noch in den nach Lidforss Methode fixierten Zellen eine besondere Kernmembran wahrnehmen. Die sog. „kinoplasmatischen Aufhängefäden“ (Miehe 1899) oder „kinoplasmatischen Verbindungsfäden zwischen Zellkern und Chromatophoren“ (Lidforss 1908) sind nichts anderes als die längst bekannten Plasmafäden des gewöhnlichen zirkulierenden Cytoplasmas.

Die in fixierten Zellen sehr deutliche Kernmembran läßt sich nach Yamaha[2]) in vivo nicht immer wahrnehmen. Die Netz- und Anastomosenstrukturen der Karyotinelemente hält er für Kunstprodukte usw.

Schraubige Figuren werden nach der Fixierung dadurch vorgetäuscht, daß Vakuolisierung eintritt und die Oberfläche höckerig wird (Schaede).

Grieß[3]) dagegen ist der Ansicht, daß die gefärbten Präparate natürliche Strukturen zeigen und daß die Untersuchungen am lebenden Kern unsere Kenntnisse nicht erweitert haben.

Vgl. über diese Probleme noch K. Bělař, Über die Naturtreue des fixierten Präparats, Verhandlungen des V. intern. Kongr. f. Vererbungsforschung, Berlin 1927, S. 402—407 und Schaedes Referat dazu in Protoplasma, 1929, VI, S. 206.

Die Kerne der Konjugaten zeigen — mit Ausnahme von Spirogyra — keine Abweichungen vom typischen Bau eines Kerns der höheren Pflanzen. Die Kerne der Diatomeen unterscheiden sich von denen aller anderen Organismen durch die aus dem Centrosom hervorgehende Zentralspindel. Der Kern der Peridineen zeichnet sich durch einen erheblichen Gehalt an Chromatin aus, das — wohl allgemein — in Form von Fäden auf den Kern verteilt ist. Normal ist der Ruhekern der Grünalgen. Centrosomen mit Plasmastrahlung als Zellorgane sind charakteristisch für die Phaeophyceen. Der Kern der Rhodophyceen zeigt bei verschiedenen Gruppen Verschiedenheiten. Näheres s. v. Neuenstein[4]).

Die Färbung der Algenzellkerne erfolgt am besten durch Heidenhains Eisenhämatoxylin, durch das sich jedoch die Pyrenoide fast genau so färben wie die Kerne. Delafields und Heglers Hämatoxylin vermeiden dies. Für rasche Orientierungen wird Färbung mit Hämalaun (Herstellung nach Strasburgers botan. Praktikum) empfohlen.

Von Vorteil ist es, nach dem Färben etwas Chloralhydrat (5 : 1 Wasser) zu den Präparaten zuzusetzen. Während alle andern Inhalts-

[1]) A. Åkerman, Studies ofver trådlika protoplasmabildningar i växtcellerna. Ett bidrag till kännedomen om protoplasmats struktur och konfiguration, Lunds Universitets Årsskrift Nr. 1, Adv. 2, Bd. 12; auch Inaug.-Diss. Lund 1915; Ref. Bot. Zentralbl. 1916, CXXXI, S. 417.

[2]) G. Yamaha, Über die Lebendbeobachtung der Zellstrukturen, nebst dem Artefaktproblem in der Pflanzenzytologie, Bot. Mag. Tokyo, 1926, XL, S. 472; Ref. in Zeitschr. wiss. Mikr. 1926, XLIII, S. 445.

[3]) J. Grieß, Genetische und gärungsphysiologische Untersuchungen an Nektarhefen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1926, LXVI, S. 109.

[4]) H. v. Neuenstein, Über den Bau des Zellkerns bei den Algen und seine Bedeutung für ihre Systematik, Arch. f. Zellforschung, 1914/15, XIII, S. 1.

bestandteile der Zelle verquollen und nur noch diffus gefärbt waren, behielt der — nur wenig verquollene — Kern seine Farbe vollständig.

Chloraljod (gelbbraun, fast gelb) läßt die Pyrenoide in den meisten Fällen von den Kernen unterscheiden. Es färbt den Stärkehof um die Pyrenoide blau.

Über den Zellkern der Protophyten s. u. a. B. Schussnig, Ber. Deutsch. bot. Ges. 1919, XXXVII, S. 193.

Die Bildung der Chromosomen ist ein kolloidaler Entmischungsvorgang; das Sol des Ruhekerns verwandelt sich während der Prophase in ein Gel von besonderer Struktur (Schaede).

Über die Bedeutung der Chromosomen für die Erblichkeitsforschung s. etwa Tischler, Allgemeine Pflanzenkaryologie (Linsbauers Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. II), aber auch R. Fick, Einiges über Vererbungsfragen, Abhandlgn. Preuß. Akad. d. Wissensch. Phys. math. Kl., 1925, III, S. 1.

Die Nukleolen normaler ruhender Kerne von Galtonia candicans Decsne. fand Kiehn[1]) meist annähernd kugelig oder doch nur wenig in einer Richtung gestreckt, aber nie linsenförmig abgeplattet. Doch sind auch länglich eiförmige, sichelförmige selbst gelappte Nukleolen beobachtet worden.

Amöboide Formen der Nukleolen entstehen nach Schaede[2]) durch Entmischung des Kernsols bei der Fixierung.

Arthur Meyer (Analyse der Zellen) definiert die Nukleolen als neu in einer Vakuole des Kerns entstehende ergastische Ante, welche aus einer aus Eiweißstoffen, wohl immer Nukleoproteiden, bestehenden Gallerte gebildet sind. Sie bestehen nach demselben Verfasser aus einer amikroskopisch strukturierten Tröpfchengallerte, erscheinen infolgedessen trüb und führen mehr oder minder zahlreiche Höhlchen.

Nach Tröndle[3]) bestehen die Nukleolen von Spirogyra aus Nukleoproteiden. Zwischen ihnen und den Chromosomen höherer Pflanzen bestehe Übereinstimmung, während die Nukleolen der höheren Pflanzen sich abweichend verhalten.

Im Zellkern von Spirogyra setiformis beobachtete Czurda[4]) ein Gebilde, das anscheinend mit dem Zwergnukleolus Wisselinghs identisch ist.

Die Nukleolen lassen sich schon durch Wasser sichtbar machen, da dadurch der Kern homogen wird, die Nukleolen dagegen nicht verändert werden und stark hervortreten.

[1]) Ch. Kiehn, Die Nukleolen von Galtonia candicans Decsne, Diss. Marburg, 1917.

[2]) R. Schaede, Vergleichende Untersuchungen über Cytoplasma, Kern und Kernteilung im lebenden und im fixierten Zustand, Protoplasma, 1927, III, S. 145.

[3]) A. Tröndle, Der Nukleolus von Spirogyra und die Chromosomen höherer Pflanzen, Zeitschr. f. Bot., 1912, IV, S. 721.

[4]) V. Czurda, Über ein bisher wenig beobachtetes Gebilde und andere Erscheinungen im Kerne von Spirogyra (setiformis Kütz.), Arch. Protistenkd., 1922, XLV, S. 163.

Nach den von A. Meyer hauptsächlich an den Nukleolen der Kerne von Allium cepa gewonnenen Erfahrungen verhalten sich die Nukleolen folgendermaßen: Kaltes Wasser löst nicht, absoluter Alkohol und Wasser von 100° denaturieren. 2proz. Kalilauge und 10proz. Sodalösung lösen vollständig, 10proz. Natriumchloridlösung löst nur etwas Substanz heraus; Pepsin verdaut allmählich vollständig, Trypsin löst schnell. 5proz. Chromsäure löst die Nukleolen vollständig, konzentrierte Phosphorsäure läßt einen Rest (und die Chromosomen) ungelöst. Salpetersäure (33proz.) färbt gelb; Millons Reaktion positiv.

Obwohl es eine spezifische Nukleolenfärbung nicht gibt, lassen sich doch Verfahren finden, die die Nukleolen hervortreten lassen.

Nach Zacharias färbt ammoniakalische Karminlösung besonders stark die Nukleolen, essigsaure die Chromosomen. Mit Säurefuchsin-Methylenblau lassen sich die Nukleolen blau oder rot, mit einem Gemisch von Fuchsin und Jodgrün die Nukleolen rot, das Chromatin grün färben. Flemmings Safranin-Gentianaviolett-Orange färbt Nukleolen rot, Chromatin blau oder violett, Wagers Gentianaviolett-Safranin färbt Nukleolen rot, Chromosomen tiefrot, das Cytoplasma violett.

Kiehn fixiert mit Sublimateisessig und bevorzugt zur Hervorhebung der Nukleolen die Montgomerysche Doppelfärbung. Die Schnitte gelangen zunächst 40 Minuten bis 1 Stunde in eine Lösung von Ehrlichs Alaunhämatoxylin, werden darauf gut gewässert und 5 bis 10 Minuten in eine Lösung von 0,5 g Eosin in 100 ccm 70proz. Weingeist gebracht, in 95proz. Weingeist ausgewaschen und wie üblich weiter behandelt. Nukleolen und Eiweißkristalle sind hellrot, Chromatin und Chromosomen violett. Nach Fixierung mit Sublimateisessig vorgenommene Färbung mit Säurefuchsin (10 g Säurefuchsin Grübler, 3 ccm Anilin, 100 ccm Wasser) und nachfolgende Differenzierung in einer kaltgesättigten wässerigen Pikrinsäurelösung läßt die Nukleolen violett erscheinen, das ruhende Chromatin und die Chromosomen rot. Bei der sog. Dreifachfärbung (s. S. 72 u. 754) werden die Nukleolen rot, die Chromatinkörner violettblau.

Wie über die Struktur, so gehen auch über die chemische Zusammensetzung des Kerns und seiner Teile die Ansichten noch auseinander. Dies hängt damit zusammen, daß es sehr schwer ist, größere Mengen von Kernen für makrochemische Untersuchungen ohne Beimengung von Plasma zu erhalten, die mikrochemischen Reaktionen andererseits nicht ausreichen, um bestimmte Eiweißstoffe mit Sicherheit zu identifizieren. Insbesondere ist dies mit den auf diesem Gebiete so reichlich angewandten Färbungsverfahren nicht möglich.

Pratje[1]) kommt zu der Ansicht, daß wir keine wirklich einwandfreie mikrochemische Reaktion besitzen, die über den Aufbau und die nähere Lokalisation der Eiweißkörper in den Zellkernen etwas Näheres aussagt. Selbst die Versuche mit Alkalien, verdünnten Salzlösungen und Säuren haben teilweise widersprechende Ergebnisse geliefert. Sicher ist nur, daß „Chromatin" von künstlichem Magensaft nicht angegriffen wird.

Nach Versuchen von Steudel und Osato[2]) (an tierischem Material) ist die Kernfärbung mit basischen Farbstoffen eine doppelte Umsetzung zwischen nukleinsauren Eiweißstoffen und den Farbsalzen. „Chromatine" sind demnach Salze der Nukleinsäure mit den Farbbasen, ebenso die Chromosomen.

Es würde also demnach ebensoviele „Chromatine" geben, als es entsprechende Farbstoffverbindungen gibt. Doch bedarf die Frage nach der Verschiedenheit der Chromatine wohl noch weiterer Untersuchungen.

Vgl. dazu M. Lenoir, Méthode de différenciation des chromatines nucléaires par l'hématoxylin et la safranine après fixation au Bouin-Dubosq-Brasil, Rev. gén. Bot., 1926, XXXVIII, S. 354.

Nach v. Derschau[3]) spielen bei den verschiedensten physiologischen Funktionen Nuklein und Plastin die Hauptrolle, während das Cytoplasma vorzüglich ein System von Transportwegen darzustellen scheint, vermittels welcher die Substanzen des Kerns in die entlegensten Teile der Zelle gelangen können.

Mitochondrien, Plastochondrien, Centren, ergastoplasmatische und verwandte Bildungen, auch Chlorophyllkörner sind Kernderivate. Auch bei der Verholzung, lokalen Wandverdickungsprozessen und der freien Zellbildung wird das Nährmaterial wohl fast ausschließlich vom Kern bestritten.

Unna[4]) unterscheidet in Zellkernen sechs Bestandteile: 1. Basophiles (sauer, in Alkalien löslich) Chromatin. Besteht aus Nuklein, färbt sich mit Methylgrün besonders stark, ist in Mitosen sehr reichlich und auch im Kernkörperchen vorhanden. 2. Basophiles Nukleolin. Färbt sich bei einer Methylgrün-Pyroninfärbung mit Pyronin rot. In den Kernkörperchen reichlich vorhanden, in den Mitosen neben dem Nuklein sichtbar. 3. Oxyphile (basisch, in Säuren löslich) Kerngrundsubstanz. Sichtbar, wenn alles andere herausgelöst. Plastin von Reinke. 4. Oxyphiles Chromatin. Vielleicht mit dem Linin von Schwarz identisch. Färbt sich stark mit Hämatein-Alaun. 5. Oxyphiles Nukleolin im Kernkörperchen. 6. Basophile Kerngrundsubstanz. Wie 3.

[1]) A. Pratje, Die Chemie des Zellkerns, Biolog. Zentralbl., 1920, XV, S. 88.

[2]) H. Steudel u. S. Osato, Chemische Untersuchungen über Kernfärbung, Zeitschr. physiol. Chem., 1923, CXXIV, S. 227.

[3]) v. Derschau, Zum Chromatindualismus der Pflanzenzelle, Arch. f. Zellforschung, 1914, XII, S. 220.

[4]) P. G. Unna, Biochemie der Haut, Jena 1913, Anhang zu Oppenheimers Handbuch der Biochemie.

Nach anderer Ansicht sind die Nukleine[1]) bereits Abbauprodukte der eigentlichen Kernbestandteile, als die vielmehr die Nukleoproteide zu betrachten sind.

Durch die Ehrlich-Biondische Säurefuchsinfärbung u. a. lassen sich nach Ansicht von Derschaus[2]) in Zellkernen ein saure Farbstoffe speicherndes Plastin (Oxychromatin) und ein basische Farbstoffe speicherndes Nuklein (Basichromatin) unterscheiden.

Das Chromatin des ruhenden Kerns wird von kochendem Wasser nicht gelöst, das des sich teilenden dagegen in den meisten Fällen (Němec)[3]). Chromatin wird von Trypsin gelöst; KOH, Na_2CO_3, $(NH_4)_2 SO_4$, Na_2SO_4 verquellen in schwächerer, lösen in stärkerer Konzentration. 10proz. Kochsalzlösung wirkt quellend.

Verdünnte Säuren fixieren, starke Mineralsäuren lösen.

Nach Lundegårdh[4]) ist Chromatin ein mangelhafter Begriff. Sowohl morphologisch wie chemisch läßt sich z. Zt. nur zwischen Nukleolen, Kerngerüst und Karyosomen unterscheiden. „Das Kerngerüst kann sowohl eine im einzelnen wechselnde Konfiguration besitzen, wie sehr verschieden stark entwickelt sein". Ähnlich ist es mit den Karyosomen. In dem lebenden Kern ist alles, was als geformte Substanz außer den Nukleolen erscheint, Karyotin zu nennen.

Kernfreie Zellen, deren Lebensdauer nur eine kurze ist, kann man aus in Teilung begriffenen Conjugaten erhalten. Man läßt auf Spirogyra oder Zygnema während der Teilung 15 Minuten bis mehrere Stunden Chloralhydrat (0,25—1,5 ccm konzentrierte Lösung in 100 ccm Wasser), Äther (0,5—2,5 ccm) oder Chloroform (1,25—7,5 ccm) einwirken und bringt die Algen dann in frisches Wasser. Unter den einzelnen Schwesterzellen finden sich Zellen mit einem großen Kern oder mit zwei Kernen normaler Größe und andererseits kernlose Zellen. Der gleiche Effekt läßt sich durch plötzliche Abkühlung erzielen[5]). Ähnliche Beobachtungen machten Haberlandt (Bryonia), Schmitz u. a.

Bei diesen Vorgängen treten Kernteilungen ein, die Amitosen und abnormalen Mitosen ähnlich sind. Dergleichen lassen sich künstlich hervorrufen nach Nathansohn (Jahrb. wiss. Bot., 1900, XXXV, 48) bei Spirogyren (über Nacht

[1]) Unlösliche pflanzliche Phosphatide zeigen dieselben Reaktionen wie die Nukleine der Zellkerne, so daß möglicherweise die Nukleinreaktionen vom Stickstoffkomplex der Phosphatide herrühren. V. Grafe, Zur Physiologie und Chemie der Pflanzenphosphatide, Biochem. Zeitschr., 1925, CLIX, S. 444.

[2]) M. v. Derschau, l. c. S. 747, 3.

[3]) B. Němec, Zur Mikrochemie der Chromosomen, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1909, XXVII, S. 43. Derselbe, Das Problem der Befruchtungsvorgänge und andere zytologische Fragen, Berlin 1910.

[4]) H. Lundegårdh, Fixierung, Färbung und Nomenklatur der Kernstrukturen, Arch. mikrosk. Anatomie, 1912, LXXX, S. 223.

[5]) J. Gerassimoff, Über ein Verfahren, kernlose Zellen zu erhalten (Zur Physiologie der Zelle), Moskau, 1896.

kühl gestandene Algen gelangen auf 3/4 Stunden in 1proz. wässerige Ätherlösung), bei Closterium (1/4 % Ätherlösung), Tradescantia virginica (Staubfadenhaare, Blütensprosse mit Knospen 36 Stunden in 2proz. Ätherlösung unter Glasglocke), nach Wisselingh (Bot. Ztg., 1903, LXI, 202) bei Spirogyra (2—12 Tage in 1/20 proz. Chloralhydrat in Grabenwasser), nach Wasielewski (Jahrb. wiss. Bot., 1904, XXXIX, 581) bei Vicia faba (Keimwurzeln, Bohnen 24 Stunden quellen, 5 Tage in 0,1—0,2proz. Chloralhydrat oder in 2proz. Ätherwasser, dann auswaschen und auf einige Tage in Sägespäne aussäen). In allen Fällen handelt es sich um echte Mitosen, die durch Äther oder Chloral in verschiedenen Stadien zum Stillstand gebracht wurden und Amitosen vortäuschen (B. Němec, Jahrb. wiss. Bot., 1904, XXXIX, 645); Derselbe, Das Problem der Befruchtungsvorgänge und andere zytologische Fragen, Berlin 1910.

Die Kernwand des ruhenden Kernes ist wenig tinktionsfähig. Sie läßt sich nach Schwarz (Lit. S. 715,1) durch eine konzentrierte wässerige Lösung von Kaliumdichromat oder durch 20proz. Kochsalz- oder Monokaliumsulfatlösung deutlich sichtbar machen. Während der Karyokinese wird sie resorbiert. Um sie in den verschiedenen Phasen der Karyokinese verfolgen zu können, ließ van Wisselingh (Bot. Ztg., 1902, LX, 115) lebendes Material langsam sterben (Spirogyra) und benutzte zunächst 10proz. Lösung von Kalisalpeter. Die besten Resultate gaben 1 und 2 % mit Eosin gefärbtes Chloralhydrat. Der Kern wird „sehr deutlich gefärbt und ist also, wenn seine Wand noch intakt ist, scharf von seiner Umgebung zu unterscheiden".

Die Grundmasse des Zellkernes verhält sich nach Zacharias wie folgt: „Sie quillt in verdünnter Salzsäure und Magensaft, färbt sich nicht in Essigkarmin, Methylgrünessigsäure (nach Behandlung mit Magensaft), quillt in verdünnter Kalilauge und wird dann beim Erwärmen zerstört, desgleichen verschwindet sie, wenn 0,5proz. Kalilauge, 0,5 oder 1proz. Soda auf die nach der Verdauung zurückbleibenden Reste einwirken. In stärkerer Salzsäure bleiben Grundmasse und Verdauungsreste gut erhalten. Die Grundmasse färbt sich nach Vorbehandlung mit verdünnter Salzsäure mit Methylenblau-Fuchsin S rot. Mit Methylgrünessigsäure-Glaubersalz wird sie ohne zu quellen blau. Sie quillt auch nicht in 10proz. Chlornatrium und in Glaubersalzlösung."

Bei den Zellkernstudien stehen Färbungen an erster Stelle. Die histologischen und namentlich die cytologischen Färbungen sind aber wie hier nochmals bemerkt sei, in erster Linie als ein Hilfsmittel zur Erforschung der Zell- und Kernstrukturen zu bewerten. Wenn wir uns aber der Färbungen zur Identifizierung zweifelhafter Gebilde bedienen, so können wir diese Färbungen als mikrochemische Reaktionen im weiteren Sinne betrachten. Wohl ist der Zellkern in lebenden Zellen meist ohne weiteres zu erkennen, doch schwer ist seine Bestimmung zuweilen in getrockneten Pflanzen und vielfach dann, wenn

stärke- oder aleuronhaltige Gewebe vorliegen oder der Kern nur klein und von ungewöhnlicher Form ist. Nicht immer führt direktes Eintragen der Schnitte in Chloralhydrat zum Ziel. Leicht werden andere Inhaltskörper als Zellkerne angesprochen. Häufig sind Verwechslungen von Zellkernen und Oxalaten.

Oehlkers[1]) befreite Charazygoten von Stärke, um die Kerne sichtbar und färbbar zu machen, indem er die bereits auf den Objektträger aufgeklebten Schnitte auf ca. 90° erwärmte und sodann in eine Lösung von Diastase brachte (75 g gemahlenes Malz mit 100 ccm Wasser, nach einigen Stunden abfiltriert und dann sofort gebrauchsfähig). Die Verzuckerung der Stärke geht bei einer Temperatur von 38—40° rasch vonstatten. v. Büren[2]) wendet dieses Verfahren ebenfalls mit gutem Erfolg an, wenn es sich um den Nachweis von Pilzhyphen in Rhizomen handelt.

Es sollen zunächst jene einfachen Methoden angeführt werden, die Fixieren und Färben vereinen, auf dem Objektträger ausgeführt werden und zum Nachweis ruhender Kerne meist benutzt werden.

Gute Erfolge liefert Methylgrünessigsäure[3]) (1—2proz. Essigsäure wird mit Methylgrün bis zur blaugrünen Färbung versetzt). Das Reagens wird mit einem Tropfen verdünnten Glyzerins versetzt und das Objekt eingelegt. Die Methode wird auch herangezogen, um Teilungszustände auf bequeme Weise schnell beobachten zu können; man zerdrückt die jugendliche Anthere einer Monokotylenblüte auf dem Objektträger in dem Reagens. (Carnoy[4]) verwendet eine stärkere Essigsäure [1 Teil Eisessig, 3 Teile absoluten Alkohol]). In gleicher Weise läßt sich Jodgrün oder Gentianaviolett, in 1—2proz. Essigsäure gelöst, benutzen. Die Färbung hält sich nur wenige Stunden. Jugendliche Membranen sollen in dem Reagens zuweilen stark aufquellen.

Nigrosin-Pikrinsäure führte Pfitzer[5]) ein (eine konzentrierte

---

[1]) Fr. Oehlkers, Beitrag zur Kenntnis der Kernteilungen bei den Characeen, Berichte d. Deutschen botanischen Ges., 1916, XXXIV, S. 223.

[2]) G. v. Büren, Beitrag zur Kenntnis des Mycels der Gattung Volkartia, R. Maire (v. Büren), Mitteil. d. Naturf.-Ges. in Bern, 1916.

[3]) Methylgrün wurde von J. Hanstein zum Färben von Chlorophyllkörnern benutzt, später von Treub zur Färbung von Zellkernen empfohlen (S. d. cell. vég. à plus. noyaux, Arch. Néerl., 1880, XV, S. 7). In Kombination mit Essigsäure führte E. Strasburger den Farbstoff ein (Zellbild. u. Zellteil., 1880).

[4]) J. B. Carnoy, La cytodiérèse de l'œuf chez quelq. Nématodes, La Cellule, 1887, III, S. 6 u. 276.

[5]) E. Pfitzer, Über ein Härt. u. Färb. vereinig. Verf. f. d. Unters. d. plasmat. Zelleibes, Ber. d. bot. Ges., 1883, I, S. 44. — Nigrosin wurde als Kernfärbemittel zuerst von L. Errera benutzt (Coloration des noyaux par la nigrosine, Soc. belg. de Micr., 1881, VII, No. 8).

wässerige Pikrinsäurelösung wird mit wenig wässeriger Nigrosinlösung bis zur tief olivgrünen Färbung versetzt). Die Objekte bleiben einige Stunden bis 1 Tag in der Farblösung, werden mit Wasser, Weingeist oder Glyzerin ausgewaschen; die Färbungen sind haltbar. Nach Glyzerin folgt Einschließen in Glyzeringelatine; bessere Resultate gibt Auswaschen mit Weingeist, dann Nelkenöl, Kanadabalsam. Die Färbung des Plasmas hängt von der Beschaffenheit desselben ab, dünne Plasmaschichten werden kaum wahrnehmbar gefärbt, Zellkern und Nukleolen aber sehr stark blau. Zellulosemembran und Stärke bleiben ungefärbt.

Hämatoxylinfärbungen (früher für die besten gehalten, Johow, Zellk. in Sekretbeh. d. Monocotyl., Diss. Bonn, 1880, S. 9) werden auch heute noch vielfach zu rein diagnostischen Zwecken herangezogen. Hämatoxylin fäbt in Gegenwart einer Beize, eines Eisen-, Kupfer- oder Aluminiumsalzes, die Zellkerne oft schon nach einstündiger Einwirkung tiefblau. Sind diese Salze im Gewebe enthalten, dann tritt mit Hämatoxylin allein eine wenn auch schwache Färbung ein. Will man größere Objekte färben (Stückfärbung), dann beläßt man sie mehrere Tage in einer mit Wasser verdünnten Hämatoxylinlösung. Weingeistmaterial muß zur Vermeidung von Niederschlägen zuvor auf einige Zeit in Wasser gelegt werden. Zur Differenzierung benutzt man Säurealkohol, 2proz. wässerige Alaunlösung, 1proz. Kaliumdichromat oder konzentrierte wässerige Pikrinsäure. Diese Flüssigkeiten müssen vor dem Übertragen der Präparate in Weingeist, Kanadabalsam oder Glyzeringelatine sorgfältig ausgewaschen werden. Stärkereiche Schnitte entwässert man nach der Färbung (in einfachster Weise durch Austrocknen an der Luft) und fügt Nelkenöl zu, wodurch die Stärkekörner hyalin werden und die Kerne sofort auffallen.

Hämatoxylinlösungen werden meist nach Böhmer und Delafield bereitet. Böhmer: Lös. I (0,35 g krist. Hämatox. in 10 g absolutem Alkohol) Lös. II (0,3 g Kalialaun in 10 g Wasser). 10 Tropfen von I werden mit II gemischt, die Mischung wird nach mehrtägigem Stehen im Licht filtriert. — Delafield: Lösung I (gesättigte Lösung von kristallisiertem Hämatoxylin in absolutem Alkohol), Lösung II (gesättigte wässerige Lösung von kristallisiertem Ammoniakalaun). 4 ccm von I mit 150 ccm von II mischen, die Mischung nach 8tägigem Stehen im Lichte filtrieren; das Filtrat, mit 22 ccm Glyzerin und 25 ccm Methylalkohol versetzt, bildet das Reagens. — Sofort gebrauchsfertig ist die Lösung von P. Mayer (1 g Hämatoxylin, 1000 g Wasser, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Alaun), sowie die von Hansen, die aber umständlicher in der Herstellung ist (1 g kristallisiertes Hämatoxylin in 10 g absolutem Alkohol, dann 20 g Kalialaun in 200 g Wasser. Am anderen Tage beide Lösungen mischen und 200 g des Gemisches mit 3 ccm konzentrierter wässeriger Kaliumpermanganatlösung zum Sieden erhitzen, abkühlen, filtrieren). Weitere Vorschriften (Apáthy, Ehrlich) bei Behrens-Küster, Mikr. Tab., 112.

Bei aleuronhaltigen Samen[1]) ist die Entfernung des Öles notwendig, man wird vorteilhaft mit einer wässerigen Lösung von Methylenblau färben. Die Aleuronkörner, die gleichfalls den Farbstoff speichern, werden entfernt (eintägige Behandlung mit 0,3proz. Salzsäure). Die Aleuronkörner vieler Pflanzen sind nun vollständig gelöst, die schwerlöslichen immerhin so angegriffen, daß sie die Beobachtung nicht stören. Will man aber die schwerlöslichen Aleuronkörner gänzlich entfernen, so läßt man 24 Stunden Pepsin-Pankreatin einwirken (1 Teil Pepsin, 1 Teil Pankreatinglyzerin, 20 Teile 0,3proz. Salzsäure). In schwierigen Fällen wird die Färbung durch Chloralhydrat unterstützt; Chodat[2]) läßt auf die mit Methylgrünessigsäure gefärbten Protococcideen Chloralhydrat (8 : 5) einwirken, welches Chromatophoren und Plasma löst und die Stärke verquillt, und A. Meyer[3]) empfiehlt zur Färbung der Kerne in Pollenkörnern Chloralcarmin (0,5 g Carmin, 30 ccm Alkohol, 30 Tropfen off. Salzsäure auf dem Wasserbade ½ Stunde kochen, nach dem Erkalten 25 g Chloralhydrat zufügen, mehrmals filtrieren; die Lösung ist haltbar).

Der von Overton (Lit. S. 379, 1) empfohlene mikrochemische Nachweis (Nitella, stärkereiche Eizelle) durch Bildung von Berlinerblau (S. 668) ist umständlich; die Lösung der Stärke erfolgt bei der stark verdünnten Säure zu langsam, man muß schließlich zum Chloral greifen. — In Sekretbehältern (Lit. S. 264, 2) lassen sich die Kerne mit Chromatschwefelsäure (S. 153 oder einem Gemisch von Kaliumdichromat und Schwefelsäure im Überschuß oder 1 Wasser, 4 konzentrierte Schwefelsäure, gesättigt mit Chromsäureanhydrid) sichtbar machen.

Die bisher angeführten Färbungen dienen überwiegend nur diagnostischen Zwecken. Zu eingehenden Studien, besonders der Teilungsvorgänge, sind gut fixierte, gehärtete und gefärbte Schnitte erforderlich (S. 58). Diese Zellkernforschungen haben sich zu einem selbständigen Zweige entwickelt. Es muß auf die Spezialliteratur verwiesen werden. Immerhin scheint es angebracht, einige der zum Fixieren und Färben dienenden Methoden anzuführen, vorzüglich die Zusammensetzung der Reagentien zu erwähnen, zumal die Färbungen nicht nur zum Studium des Zellkernes sondern auch der übrigen Bestandteile des Protoplasten dienen.

Lebende Zellkerne können sich gegen Farbstoffe anders verhalten als die getöteten (fixierten), wahrscheinlich deshalb, weil beim Absterben eine Umsetzung labiler Eiweißgruppen stattfindet. Doch ist es mehrfach gelungen, lebende Zellkerne zu färben. Zwar hatten die Ver-

[1]) W. Koeppen, Verhalt. d. Zellk. im ruhend. Sam., Diss. Jena, 1887, S. 7.

[2]) R. Chodat, Entw. d. Eremosphaera viridis, Bot. Ztg., 1895, LIII, S. 137.

[3]) A. Meyer, Chloralcarmin zur Färbung der Zellkerne der Pollenkörner, Ber. Deutsch. bot. Ges., 1892, X, S. 363.

suche von Campbell[1]), der im Anschluß an die Lebendfärbung des Plasmas lebende Zellkerne (Tradescantia virg.) mit 0,001—0,002proz. wässerigen Lösungen von Methylviolett, Mauvein oder Dahlia färbte, nur geringen Erfolg. Doch konnten Kite und Chambers[2]) mit Janusgrün, van Goor[3]) mit Toluidinblau, Neutralrot und Bismarckbraun Färbungen erzielen.

Gicklhorn konnte Tradescantiablätter mit Erythrosin und Essigsäure so färben, daß die Teilung eine Zeitlang fortschritt, auch wenn die Chromosomen deutlich rot waren.

Zu den **Färbungen**[4]) dienen Anilinfarben, Hämatoxylin, Carmin u. a. Von den zahlreichen Anilinfarben seien ebenfalls nur einige angeführt:

Fuchsin (nach Zimmermann, Mikrot. S. 183), konzentrierte wässerige Lösung, 15—20 Minuten Einwirkung, Nachbehandlung mit Pikrinsäure (konzentrierte Lösung in 70proz Weingeist), Auswaschen mit 90proz. Weingeist, schnelles Abspülen mit absolutem Alkohol, dann Xylol, Kanadabalsam. — Karbolfuchsin (Ziehlsche Lösung, 1 Teil Fuchsin, 5 Teile Karbolsäure, 10 Teile Alkohol, 100 Teile Wasser) für Bakterien; bei Wurzelpilzen[5]) nach Fixierung mit Merkel. — Von Fuchsingemischen seien genannt: Fuchsin-Methylblau, die mit Fuchsin gefärbten Schnitte werden mit Pikrinsäure behandelt, dann Auswaschen in 90proz. Weingeist und ¼ Stunde in wässeriger Methylblaulösung. — Fuchsin-Methylenblau (Rosen). Nacheinander 0,001proz. wässerige Fuchsinlösung, 0,002proz. wässerige Methylenblaulösung, Alkohol, Xylol-Alkohol, Nach Ehrlich werden von gesättigten wässerigen Lösungen 5 Teile Fuchsin mit 1 Teil Methylenblau gemischt, die Mischung + 5 Teilen Wasser, nach 4 Tagen filtriert. Einwirkung 1—2 Tage, dann Pikrinsäure in 50proz. Weingeist. Überfärbung wird durch Weingeist beseitigt.

[1]) H. D. Campbell, The Stain. of liv. Nucl., Arb. Tübing. Inst., II, S. 569.

[2]) G. L. Kite u. R. Chambers jr., Vital staining of chromosomes and the function and structure of the nucleus, Science, N. Ser. 1912, XXXVI, S. 639.

[3]) A. C. J. van Goor, Die Cytologie von Noctiluca miliaris im Lichte der neueren Theorien über den Kernbau der Protisten, Arch. f. Protistenkunde, 1918, XXXIX, S. 147.

[4]) Göppert u. Cohn färbten Nitella mit Carmin (Rotation d. Zellinhaltes, Bot. Ztg., 1843, I, Nr. 37), Hartig studierte die Carminspeicherung der Zellkerne und färbte mit Lackmus, Gummigutti u. a. (Funkt. d. Zellk., Bot. Ztg., 1854, XII, Nr. 33 u. a.). Auf botanischem Gebiete ist Th. Hartig, auf tierhistologischem, J. Gerlach der Begründer der Färbungen (Mikr. Stud. d. menschl. Morph., Erlangen, 1858). Hierzu: H. Gierke, Färberei z. mikr. Zwecken, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, 62, Holzner, Z. Geschichte d. Tinktionen, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1884, I, 255, J. Sachs, Gesch. d. Botanik, 1875, S. 523. Anilinfarben (Rosanilin, Anilinblau, Anilinviolett) gebrauchte zuerst Waldeyer (Zeitschr. f. rat. Med., 1863, XX, 200).

[5]) C. G. Björkenheim, Zeitschr. f. Pflanzkr., 1904, XIV u. Fr. Zach, Sitzgsb. Wien. Ak., 1909, CXVIII, Abt. 1, S. 192.

Fuchsin-Jodgrün (Strasburger [Bot. Pract. 1897, S. 102 u. a.] 1 Teil konzentrierte wässerige Fuchsinlösung und 9 Teile 0,1proz. Jodgrünlösung oder beide Farbstoffe in 50proz. Weingeist. Die Jodgrünlösung wird der Fuchsinlösung bis zur Violettfärbung zugesetzt. Guignard [Rev. gén. de Bot. 1889, I, S. 11 und flg.] gebraucht wässerige Lösungen. Einwirkung, mikroskopisch zu kontrollieren, eine bis wenige Minuten, Zellkerne blaugrün, Plasma rot. Auswaschen mit Jodalkohol (0,1 g Jod, 1 ccm Essigsäure, 100 ccm Alkohol), Abspülen mit Xylol, Einschließen in Kanadabalsam. Fuchsin-Jodgrün läßt sich mit anderen Farbstoffen kombinieren. Die mit Sublimat, Alkohol oder Pikrinsäure fixierten Präparate gelangen zunächst auf einige Minuten in wässerige Safranin- oder Vesuvinlösung und darauf für eine Minute in Fuchsin-Jodgrün oder in Methylenblau-Safranin. Die Doppelfärbungen sind in Kanadabalsam haltbar.

Bismarckbraun (konzentrierte wässerige Lösung [erhitzen, filtrieren] oder mit Alkoholzusatz) wird überwiegend allein benutzt, während Eosin zu Doppelfärbungen dient. Bei der Färbung mit Gentianaviolett (Methylviolett 5 B) kommen die mit Chromsäuregemischen fixierten Präparate auf einige Minuten in die Farblösung (1 Teil Gentianaviolett, 3 Teile Anilin, 15 Teile Weingeist, 100 Teile Wasser), dann Abspülen mit Weingeist, Nachbehandlung mit Jod bis zur Dunkelfärbung (1 J, 2 KJ, 300 Wasser). Auswaschen mit Weingeist, Nelkenöl, Kanadabalsam (Gram sches Verfahren, A. Zimmermann, Mikrot. 1892, 181). Wird dem Nelkenöl Eosin zugesetzt, dann erhält man Doppelfärbungen. Gentianaviolett-Eosin gebrauchte Oltmanns (Flora, 1895, LXXX, S. 388) bei mit 1proz. Chromsäure fixierten Vaucherien. — Eosin-Methylenblau (Mann), 5 Minuten in 1proz. wässeriger Eosinlösung, dann 25 Minuten in 4proz. wässeriger Methylenblaulösung, Abwaschen, absoluten Alkohol, Xylol, Kanadabalsam. Plasma rot, Chromatin und Nukleolen dunkelblau. — Eosin-Hämatoxylin (O. Kaiser, Bot. Ztg., 1896, LIV, S. 66) ist nicht für Dauerpräprate.

Safranin-Gentianaviolett-Orange (sog. Dreifachfärbung Flemming[1])). Fixiert wird mit Osmiumgemischen. Bei Benutzung von Weingeistmaterial müssen die auf dem Objektträger befestigten Schnitte zunächst mit 1proz. Chromsäure 24 Stunden gebeizt und 2 Stunden in Wasser gelegt werden (Strasburger). Zuerst 1 bis 2 Tage weingeistige Safraninlösung[2]), dann folgt nacheinander Abwaschen mit

[1]) W. Flemming, Neue Beiträge zur Kenntnis der Zelle, Arch. f. mikr. Anat., 1891, XXXVII, 249 u. 685 Anm. Vgl. ferner: H. v. Winiwarter u. G. Sainmont, Erfahrungen über die Flemmingsche Dreifärbung, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1908, XXV, S. 157. Dort wird mitgeteilt, daß die Safranine des Handels sehr ungleichwertig sind. Die besten Resultate geben (bei tierischen Geweben) Safranin Grübler 20, de Haen I, Schuchardt 0.

[2]) Nach P. Claussen (Ber. deutsch. bot. Ges., 1908, XXVI, 144): 0,1 g Safranin, 25 ccm 95proz. Weingeist, 25 ccm Wasser, 5 ccm Anilinwasser (1 : 300).

Weingeist, Säurealkohol (mit nur 0,1 proz. Salzsäure), kurzes Abwaschen mit Wasser, Gentianaviolett[1] (¼—1 Stunde, auch länger), rasches Abwaschen mit Wasser, konzentrierte wässerige Lösung von Orange G (Grübler) auf 2—4 Minuten (Abgabe blauer Farbwolken), Auswaschen in absolutem, eventuell einigemale zu erneuerndem Alkohol, schließlich Nelkenöl, Kanadabalsam. Bei guter Dreifärbung müssen die Chromosomen purpurrot, die Nukleolen heller rot, die Spindelfasern hellviolett gefärbt sein; Linin erscheint fast farblos.

Haematoxylinlösungen werden mit Eisenzusatz benutzt (s. S. 70) und auch mit Anilinfarben zu Doppelfärbungen vereint.

Carminlösungen werden weniger gebraucht: Alauncarmin (Grenacher, Arch. f. mikr. An., 1879, XVI, S. 465; 1 proz. wässerige Carminlösung mit 1—5 % Kalialaun), Carmalaun (P. Mayer, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1899, XVI, S. 196: ½ proz. wässerige Carminlösung mit 5 % Alaun, haltbar gemacht durch 0,2 % Salizylsäure, Partsch, Arch. mikr. Anat., 1877, XIV, S. 180), Alauncochenille (nach Csokor, Arch. mikr. Anat., 1880, XVIII, 413: 7 Teile Alaun, 70 Teile Cochenille, 700 Teile Wasser, durch Erhitzen auf 400, u. a. von R. Zander bei Milchsafthaaren benutzt, Bibl. bot., 1986), Boraxcarmin, (Grenacher; 2proz. wässerige Carminlösung, 4 Teile Borax, 100 Teile Alkohol 70 proz.) u. a.

In einer Anzahl von Fällen hat sich Indigokarmin zum Färben von Zellkernen geeignet erwiesen (Patschovsky)[2]. Man mischt auf dem Objektträger einen Tropfen tiefblauer (zwischen Objektträger und Deckglas bloß hellblau) wässeriger Indigokarminlösung mit einem Tropfen Essigsäure und taucht das Objekt in die Mischung. Vermag der Farbstoff schnell in die Zellen einzudringen, so färbt sich der Kern fast augenblicklich intensiv kornblumenblau, das Kernkörperchen noch um eine deutliche Stufe dunkler, das Cytoplasma färbt sich meist nur sehr schwach oder gar nicht, die Membranen bleiben stets ungefärbt.

Bei einer Spirogyra und bei Cladophora gelang es, durch Einlegen in Pikrinsäure zuerst die Pyrenoide gelb zu färben, dann nach flüchtigem Abspülen die Zellkerne mit der Indigokarmin-Essigsäure blau zu färben.

Färbungen nach Breindl[3].

I. Giemsa-Soda-van Gieson-Färbung.

Das mit Zenker oder anderen Sublimatkombinationen fixierte Schnittserienmaterial wird 12—24 Stunden in einer wässerigen Giemsalösung, 2 Tropfen auf 1 ccm destilliertem Wasser, der man 15 Tropfen einer 10proz. wässerigen Soda-

[1]) 0,45 g Gentianaviolett, 60 ccm Wasser, 5 ccm Anilinwasser (1 : 300).

[2]) N. Patschovsky, Indigokarmin zur Schnellfärbung des Zellkerns, Ber. deutsch. bot. Ges., 1919, XXXVII, S. 326.

[3]) v. Breindl, Über neue Färbungsmethoden, Zentralbl. Bakt. Abt. II, 1926, LXVII, S. 370.

lösung zugibt, gefärbt. Nach 12—14stündigem Aufenthalt in dieser Mischung werden die Präparate kurz im Wasserstrahl gewaschen und 3—5 Minuten mit Van-Gieson-Lösung nachgefärbt. Nach wiederholtem Waschen in Wasser gibt man die Präparate auf 10—20 Stunden in 96proz. Weingeist, am besten in einer Petri-Schale. Dann werden sie gut aber vorsichtig in absolutem Alkohol entwässert. Zellkerne sattrosa, Protoplasma schwachrosa.

II. Gentiana- und Dahliaviolett-Färbungsmodifikation.

1. Gentiana-Soda-Färbung.

Auf 1 ccm destilliertes Wasser 1—2 Tropfen gesättigte wässerige Gentianalösung, auf 2 ccm dieser Mischung 1 Tropfen 10proz. Sodalösung. Färben in der Küvette 12—24 Stunden. Nachfärben 1—2 Minuten mit wässeriger Lösung von Lichtgrün oder Orange G; 20 Sekunden 96proz. Weingeist. — Absoluter Alkohol, Xylol. — Kanadabalsam.

2. Dahlia-Soda-Färbung.

Auf 1 ccm destilliertem Wasser 1—2 Tropfen gesättigte wässerige Dahlialösung. Auf 2 ccm dieser Mischung 1 Tropfen 10proz. Sodalösung. Weiter wie in 1, nachfärben nur mit Orange G 1—2 Minuten.

Nuklealreaktion von Feulgen-Brauns[1])

Das fixierte Gewebe (bei der Fixation sollen Oxydationsmittel nach Möglichkeit vermieden werden) wird in eine 60° warme $N/_1$-Salzsäure eingetragen und wird nach 4 Stunden in fuchsinschweflige Säure übertragen, in der pflanzliche Schnitte bis 3 Stunden bleiben. Die Kerne färben sich violett.

Die Methode („Nuklealreaktion“) beruht darauf, daß durch die Hydrolyse mit Salzsäure Stoffe mit Aldehydcharakter entstehen, die mit der fuchsinschwefligen Säure einen violetten Farbstoff bilden. Darstellung der fuchsinschwefligen Säure s. S. 678, 1.

Gertz[2]) färbt die Zellkerne mit Anthocyan (Darstellung s. S. 384) aus den rotpanachierten Blättern von Croton-, Brassica-, Begonia-, Allo-

[1]) R. Feulgen-Brauns, Untersuchungen über die Nuklealfärbung, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol., 1924, CCIII, S. 415; ferner R. Feulgen u. K. Voit, Über den Mechanismus der Nuklealfärbung I, Zeitschr. physiol. Chem., 1924, CXXXV, S. 249; dasselbe II, ebenda, 1924, CXXXVI, S. 57; Über die für die Nuklearfärbung und Nuklealreaktion verantwortlich zu machenden Gruppen, ebenda 1924, CXXXVII, S. 272. R. Feulgen u. Rossenbeck, Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure usw., ebenda, 1924, CXXXV, S. 203. Vgl. dazu H. Steudel u. E. Peiser, Über die Kohlenhydratgruppe der Thymonukleinsäure, Zeitschr. physiol. Chem., 1924, CXXXII, S. 297. R. Feulgen, Abderhaldens Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden, Abt. V, T. 2, H. 10, S. 1055.

[2]) O. Gertz, Über die Verwendung von Anthocyanfarbstoffen für mikrochemische Zwecke, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1916, XXXIII, S. 7.

plectus-, Perilla- und Coleusarten, sowie den Beeren von Vitis-, Myrtillus-, Vaccinium-, Ligustrum- und Atropa-Arten.

Nach Fixierung mit absolutem Alkohol[1]) werden die aus frischem Pflanzenmaterial hergestellten Schnitte auf 12—24 Stunden[2]) in eine mit Schwefelsäure versetzte Anthocyanlösung gebracht. Nach Abspülen mit destilliertem Wasser werden sie in Bleiessig übertragen, die den in den Kernen eingelagerten Farbstoff mit blauer, blaugrüner oder grüner Farbe ausfällt und dann mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Schnitte kommen dann entweder direkt in Glyzerin oder Glyzeringelatine oder nach der üblichen Behandlung mit Alkohol und Xylol in Kanadabalsam.

Werden frisch hergestellte und mit Schwefelsäure versetzte Lösungen benutzt, so wird das Plasma nur sehr wenig gefärbt.

Bei der Nachprüfung der von Becher[3]) hauptsächlich an tierischem Material erprobten Farbstoffe fand Kisser[4]), daß eine Anzahl von ihnen auch zur Färbung pflanzlicher Kerne geeignet ist.

Die Objekte werden zunächst mit Fixierungsmitteln behandelt. Zur Herstellung der Lösungen trägt man eine Messerspitze voll (etwa 0,1 g) Farbstoff in 100 ccm der zur Lackbildung dienenden Beize ein. Als solche dienen: 5 % Chromalaun, 5 % Eisenalaun, 5 % Ferrisulfat, ein Gemisch von 2 Teilen Borsäure und 2,5 Teilen Borax in 100 Teilen Wasser, ferner 5proz. Lösungen von Aluminiumchlorid und Aluminiumsulfat. Bei den beiden letztgenannten muß man das Filtrat um ein Ausfallen des Farbstoffs zu verhindern, mit gleichviel 5proz. Lösung der Beize versetzen.

Brauchbar sind: Säurealizarinblau-Aluminiumsulfat, Gallaminblau-Borax-Borsäure, Gallocyanin-Eisenalaun, Gallocyanin-Chromalaun, Naphthopurpurin-Eisenalaun, Naphthopurpurin-Aluminiumchlorid, Naphthazarin-Aluminiumchlorid, Alizarinbordeaux-Aluminiumchlorid, Alizarincyanin RR-Aluminiumchlorid, Alizarincyanin-Ferrisulfat, Alizarincyanin G extra-Aluminiumchlorid, Gallein-Kalialaun, Alizarincyanin RR-Borax-Borsäure, Alizarincyanin RRR-Aluminiumsulfat, Anthragallol-Aluminiumsulfat, Anthragallol-Aluminiumchlorid, Gallaminblau-Borax-Borsäure, Gallaminblau-Natriumalaun, Gallein-Natriumalaun.

Als Differenzierungsmittel läßt sich ein Gemisch von 2 ccm konzentrierter Salzsäure und 100 ccm Weingeist verwenden.

[1]) Oder mit Osmiumsäuredämpfen-Alkohol nach Lidforss.

[2]) Bei Verwendung frischer Lösungen tritt die Färbung rascher ein.

[3]) S. Becher, Untersuchungen über Echtfärbung der Zellkerne mit künstlichen Beizenfarbstoffen und die Theorie des histologischen Färbeprozesses mit gelösten Lacken, Berlin 1921.

[4]) J. Kisser, Über die Brauchbarkeit Bechers neuer Kernfärbungen nach Beobachtungen an pflanzlichen Objekten. Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1923, XL, S. 115; Derselbe, Über einige weitere Bechersche Kernfärbungen, ebenda, 1924, XLI, S. 369.

Yamaha[1]) empfiehlt als Kernfärbemittel: Alizarinbordeaux in Kalium- oder Natrium-Aluminium-Alaun, Alizarincyanin in Kalium- oder Natrium-Chrom-Alaun, Alizarincyanin RR in Kalium-, Natrium- oder Ammonium-Aluminium-Alaun, Alizarincyanin G in Aluminium- oder Chromalaun, Anthrazonblau und Säurealizarinblau in Chromalaun, Alizarindunkelgrün in Natrium- oder Ammonium-Alaun, Naphthazarin in Kalium-Alaun, sowie Gallaminblau in Kalium- oder Ammonium-Alaun.

Fixierung mit Sublimat oder Pikrinsäure begünstigt die Färbung, Zenkersches und Bouinsches Fixiermittel macht die Färbungen den von Becher beschriebenen sehr ähnlich.

Färbung nach Popovici[2])

Zur Färbung des Kerns dient eine 0,01proz. frisch bereitete filtrierte Lösung von Janusgrün in Anilinwasser. Man erhitzt das Präparat damit auf dem Objektträger, bis sich Dämpfe entwickeln. Man wäscht mit viel Wasser den Überschuß des Farbstoffes weg, bringt in eine wässerige Lösung von Erythrosin, wäscht nochmals mit Wasser und entwässert. Die Differenzierung erfolgt in 95proz. Weingeist. Die Kerne heben sich blaugefärbt von der rosafarbenen Erythrosin-Grundfärbung ab. Auch der achromatische Teil des Kerns färbt sich rosa. Gibt auch infolge der Blaufärbung der Chromosomen gute Kernteilungsbilder. Bei den Spirogyren färben sich außer den Kernen die Pyrenoide, bei den Cyanophyceen nur der Zentralkörper. Zellulosemembranen färben sich nicht, verholzte Wände färben sich blau, kutinisierte schmutzig blaugrün.

Fehér u. Szilvási[3]) bringen die fixierten und mit Weingeist behandelten Schnitte nach Auswaschen mit Leitungswasser in eine 20- bis 30- oder 50proz. Lösung von Spissil (die in der wässerigen Lösung entstandene Trübung muß durch Weingeist beseitigt werden), bis sie deutlich rot gefärbt sind, einige Sekunden in Säurealkohol, kurze Zeit in 90proz. Weingeist, dann durch Nelkenöl, Xylol, Terpentinöl usw. in Kanadabalsam. Um Kontrastbilder zu erhalten, kann man noch mit 1—2proz. Gentianaviolett oder Methylgrün behandeln. Besonders werden die Nukleolen stark rot gefärbt.

Über die von Fyg[4]) an tierischem Material erprobten Kombinationen von Karmin mit Chromalaun, Eisenalaun, Aluminiumsulfat, Kupferalaun und Natriumbikarbonat liegen auf botanischem Gebiete noch keine Erfahrungen vor.

Von Verfahren zum Färben von Chromosomen seien folgende angeführt:

[1]) G. Yamaha, Über die Anwendung der Becherschen Beizenfarbstoffe auf die Pflanzenkaryologie, Bot. Mag. Tokyo, 1924, XXXVIII, S. 61. Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1925, XLII, S. 102.

[2]) H. Popovici, Nouvelle méthode de coloration du noyau par le vert Janus, Compt. rend. soc. biol., 1926, XCIV, S. 991.

[3]) D. Fehér u. J. Szilvási, Über einen neuen Farbstoff in der Bakteriologie und Histologie, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1925, XLII, S. 166.

[4]) Fyg, W., Über einige Karminfärbungen, Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikrosk., 1928, XLV, S. 442.

Verfahren von Heitz[1]):

Das einige Minuten heiß in einem Gemisch aus 4 Teilen absolutem Alkohol und 2 Teilen Eisessig fixierte und zerzupfte Material wird auf dem Objektträger mit Karminessigsäure (45proz. Essigsäure mit Karmin gesättigt und filtriert) gekocht, und zwar unter Ersatz der verdunsteten Flüssigkeit durch das Reagens so lange, bis die zerdrückte Zellmasse intensiv rot gefärbt ist. Zuletzt saugt man von dem Reagens durch und läßt abkühlen. Die intensiv gefärbten Chromosomen liegen in dem fast farblosen Plasma.

Zum Färben der Pollenmutterzellen von Tradescantia virginica verwandten Kuwada und Sugimoto[2]) nach Kellers Methode Neutralviolett extra, Rongalitweiß, Ferrichlorid-Kaliumferricyanidmischung. Sie fanden, daß Chromosomen und Chromatinfäden elektronegativ erscheinen, solange sie innerhalb des Kerns von der Kernmembran umgeben sind, elektropositiv, wenn sie direkt mit dem Cytoplasma in Verbindung stehen.

Eine kritische Studie über den Wert der Fixierungsmittel hat von Wasielewski[3]) (Wurzelspitzen von Vicia faba) ausgeführt. Die besten Resultate geben die Gemische von Flemming, Hermann und vom Rath. Dann folgten die essigsäurehaltigen Flüssigkeiten (Zenker, Carnoy, Boveri, Flemming, Keiser). Nicht so gut wie die Gemische fixieren die Einzelflüssigkeiten mit Ausnahme von Platinchlorid. Durch besondere Eigenschaften sind ausgezeichnet: Osmiumsäure, Kaliumdichromat (erhalten die Zellmasse am vollständigsten), Platinchlorid (bestes Einzelmittel für Kernteilungen), Essigsäure, Pikrinsäure (dringen schnell ein, sind strukturerhaltend).

Die Entfernung von Luft aus dem zu fixierenden Gewebe kann entweder mittels Saugpumpe oder durch Zentrifugieren in der Flüssigkeit erfolgen[4]).

Bei der Fixierung mit Dichromat hängt das Bild stark vom p_H ab. Ist die Lösung saurer als ein bestimmter kritischer Punkt, so ist die

[1]) E. Heitz, Der Nachweis der Chromosomen, Zeitschr. Bot., 1926, XVIII, S. 625. Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1926, XLIII, S. 559.

[2]) J. Kuwada and T. Sugimoto, On the staining reactions of chromosomes, Protoplasma, 1928, III, S. 531. Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1928, XLV, S. 532.

[3]) W. v. Wasielewski, Über Fixierungsflüssigkeiten in der botanischen Mikrotechnik, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1899, XVI, S. 303.

[4]) J. Kisser, Die Verwendung der Zentrifugen-Infiltrations-Methode zur Lösung mikrotechnischer Fragen, Protoplasma, 1927/1928, III, S. 507. F. Weber, Vitale Blattinfiltration, Eine zellphysiologische Hilfsmethode, Protoplasma, 1926/1927, I, S. 581.

Wirkung die der Chromsäure; gänzlich verschieden davon ist das Bild auf der alkalischen Seite des kritischen Punktes (Zirkle)[1]. Auch nach Schaede ist neben anderen Eigenschaften des Gegenstands die Reaktion des Zellsaftes von großem Einfluß auf den Ausfall der Fixierung. Über die Abhängigkeit der Fixierwirkung vom p_H der Fixierungsmittel siehe auch G. Yamaha, Ztschr. wiss. Mikrosk. 1926, XLIII, S. 412.

Im folgenden ist die Zusammensetzung der meist gebrauchten **Fixierungsmittel** (vgl. auch S. 58) angegeben:

Osmiumsäure, 1 %, 1849 von Baruell, 1865 von Schultze[2]) eingeführt, dient in Dampfform zum Fixieren kleiner Objekte, die im flachen Hängetropfen 20—30 Minuten auf die Osmiumflasche gebracht werden (Meeresalgen, Berthold). Größere Pflanzenstücke gelangen auf mehrere Stunden in 1 % Lösung, eintretende Schwärzung des Gewebes (Fett) kann leicht beseitigt werden[3]) (S. 252). — Jod (Brom) für kleinere Objekte in Dampfform. Die beschickten Objektträger kommen in den Jod-Exsikkator (S. 20) oder als Hängepräparate auf die Öffnung der Jodgefäße. Nach Fixierung wird das Auswaschen umgangen und das Jod durch Erwärmen der Präparate auf 30° entfernt. Als Fixierlösung dient Jodjodkalium und Jod-Meerwasser (Meerwasser mit Jodalkohol 1 : 10 bis zur hellbraunen Färbung versetzt). Meeresalgen werden 1 Minute in der Lösung umgeschwenkt, dann in 50proz. Weingeist übertragen und sind tinktionsfähig. Bei quellbaren Membranen am besten „45—50proz. Alkohol, der statt destilliertem Wasser Seewasser enthält" (Tobler, Lit. S. 10, 5, dann S. 48, 1 u.: G. Berthold, Beitr. z. Morph. u. Phys. d. Meeresalgen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1882, XIII, S. 704). — Pikrinsäure (konzentrierte wässerige oder weingeistige Lösung), Einwirkung bis 1 Tag, Auswaschen mit Alkohol. Störende Gelbfärbung wird mit Lithion-Alkohol entfernt (einige Tropfen einer konzentrierten wässerigen Lösung von Lithion carbonicum in 95proz. Weingeist)[4]). Lithionpikrat ist alkohollöslich. — Chromsäure (0,5—1proz. wässerige Lösung), Einwirkung bei kleineren Objekten mehrere Stunden, bei größeren (Zerkleinern!) 1—2 Tage, gründliches Auswaschen in fließendem Wasser, Härtung in Alkohol von steigender Konzentration. Fällt gleichzeitig Gerbstoffe. Für Färbungen Salzsäure-Alkohol zur Entfernung des Chroms. — Essigsäure (1—3proz.), Sublimat (konzentriert, wässerig oder alkoholische Lösung, Einwirkung bis 1 Tag, Auswaschen mit 1proz. Jodalkohol, dann Alkohol) und Platinchlorid (0,3proz. wässerige Lösung, Einwirkung bis 1 Tag) werden meist nur in Gemischen benutzt.

[1]) C. Zirkle, The effect of hydrogen-ion concentration upon the fixation image of various salts of chromium, Protoplasma, 1928, IV, S. 201.

[2]) M. Schultze, Zur Kenntnis d. Leuchtorgane von Lampyris splendidula, Arch. mikr. Anatom., 1865, I, S. 132.

[3]) Das Cytoplasma kann in befriedigender Weise nur durch Osmiumsäure-Dämpfe fixiert werden.

R. Schaede, Vergleichende Untersuchungen über Zytoplasma, Kern und Kernteilung im lebenden und im fixierten Zustand, Protoplasma, 1927, III, S. 145.

[4]) O. Jelinek, Methode z. leicht. u. schnell. Entf. d. Pikrins. aus Geweben, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1894, XI, S. 243.

Chromessigsäure (70 Vol. Chroms. 1 %, 5 Vol. Eisessig, 90 Vol. Wasser), Einwirkung bis 24 Stunden, bei Süßwasseralgen nur bis 12 Stunden, weil sonst manche Algen teilweise zerfallen (Lit. S. 48, 2). Auswaschen in Wasser, Härtung in Alkohol steigender Konzentration. — Chromosmiumessigsäure (Flemmings Gemische)[1]), vielfach anwendbar, Gewebestücke möglichst klein, Auswaschen in fließendem Wasser, dann destilliertem Wasser, Alkohol. Die fixierten Objekte lassen sich in Wasser-Alkohol-Glyzerin (gleiche Teile) aufbewahren, ohne ihre Tinktionsfähigkeit zu verlieren. Schwache Lösung (0,25 proz. Chromsäure, 0,1 Osmiumsäure, 0,1 Essigsäure in 100 Wasser); starke Lösung (15 Vol. Chromsäure 1 %, 4 Vol. Osmiumsäure 2 %, 1 Vol. Eisessig). — Als Ersatz dient Zinkchlorid-Eisessig von Juel[2]) (je 2 % Zinkchlorid und Eisessig in 50 proz. Alkohol). — Sublimateisessig (Keiser, 10. Sublimat, 300. Wasser, 3. Eisessig) von Strasburger u. a. viel benutzt (bei Farnen unbrauchbar, F. Rosen, Cohns Beitr., 1895, VII, S. 225), Einwirkung mehrere Stunden, dann Wasser, Alkohol, Jodalkohol, Alkohol. — Zenkersche Lösung[3]) (5. Sublimat, 2,5 Kaliumdichromat, 1 Natriumsulfat, 100 Wasser, 1 ccm Eisessig) empfiehlt Goetz (Eiknospe b. d. Characeen, Diss., Freiburg) bei 20stündiger Einwirkung für Characeen. — Platinchlorid-Chromessigsäure (Merkels Gemisch, Böhm u. Oppel, Taschenb. d. mikr. Techn., 1900, S. 199), Einwirkung bis 24 Stunden (je 100 Vol. Chromsäure 1 % u. Platinchlorid 1 % u. 600 Vol. Wasser). Bei Meeresalgen Aufbewahren in Seewasser-Alkohol 1 + 1 (Tobler). — Platinchlorid-Osmiumessigsäure (F. Hermanns Gemisch, Entstehung d. karyokin. Spindel, Arch. f. mikr. Anat., XXXVI, S. 569, Einwirkung 1—2 Tage (15 Vol. 1 proz. Platinchlorid, 2—4 Vol. 2 proz. Osmiumsäure, 1 Vol. Eisessig), sehr viel gebraucht; Auswaschen in fließendem Wasser, Härtung in Alkohol steigender Konzentration. — vom Rathsche[4]) Pikrinsäuregemische: Pikrinosmiumessigsäure (200 ccm gesättigte, wässer. [destilliertes Wasser], filtrierte Pikrinsäure, 12 ccm 2 proz. Osmiumsäure und nach einigen Stunden 2 ccm Eisessig). Für Kernteilungsfiguren sehr geeignet, im Plasma aber fast stets Veränderungen. — Pikrinosmium-Platinchloridessigsäure, a) starke Lösung, 200 ccm konzentrierte wässerige Pikrinsäure, 25 ccm 2 proz. Osmiumsäure, 1 g Platinchlorid in 10 ccm Wasser gelöst und 2 ccm Eisessig; b) die schwache Lösung von gleicher Zusammensetzung, aber nur 12 ccm 2 proz. Osmiumsäure. Die starke Lösung wurde von Oltmanns[5]) mit 10—20 Teilen Seewasser verdünnt bei Florideen benutzt. Einwirkung 1—5 Minuten, Auswaschen mit 70 proz. Alkohol. Damit werden auch die Chromatophoren fixiert. Bei 10 Mi-

[1]) W. Flemming, Über die Wirkung von Chromosmiumessigsäure auf Zellkerne, Arch. f. mikr. Anat., 1895, XLV, S. 162.

[2]) H. O. Juel, Studien über die Entwicklungsgeschichte von Saxifraga granulata, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1907, XXIV, S. 339.

[3]) K. Zenker, Chromkali-Sublimat-Eisessig als Fixierungsmittel, Münch. Med. Woche, 1894, XLI, S. 532.

[4]) O. vom Rath, Beitr. z. Kenntn. der Spermatogenese von Salamandra maculosa, Zeitschr. f. wiss. Zool., 1893, LVII, S. 97 und: Zur Konservierungstechnik, Anat. Anz., 1895, XI, S. 280.

[5]) Fr. Oltmanns, Entwicklgesch. d. Florideen, Bot. Ztg., 1898, LVI, S. 99.

nuten langer Einwirkung dient sie bei Characeen (Goetz) mit 12stündiger Nachbehandlung zur Entfernung der Inkrustationen. — Pikrinschwefelsäure, die nach Lee und Wasielewski „auf Plasma und Kern nachteilig" wirkt, wird vornehmlich bei niederen Pflanzen benutzt, und zwar kommen auf 100 Vol. Wasser 2 Vol. konz. Schwefelsäure, dann Pikrinsäure bis zur Sättigung (P. Mayer, Mitt. Neapel, 1881). Diese Lösung wird mit dem dreifachen Vol. Wasser verdünnt (sog. Kleinenbergsches Gemisch); sie läßt sich leichter als die reine Pikrinsäurelösung auswaschen. — Die Pikrinchromschwefelsäure Keisers besteht aus je 1 g Pikrinsäure und Chromsäure, 10 g Schwefelsäure und 1000 g destilliertem Wasser. — Pikrinessigsäure wurde von Boveri (Zellst., Zeitschr., 1887, XXI, 423) empfohlen.

Trichloressigsäure ist nach dem Vorgang von Heidenhain von Hofker[1]) als Fixierungsmittel empfohlen worden. Er verwendet im allgemeinen für pflanzliche Objekte die 10proz. weingeistige Lösung, für Diatomeen, Flagellaten, Konjugaten, Protozoen, überhaupt zur Konservierung des Planktons eine wässerige je ½—1 proz. Trichloressigsäure + Ferrichlorid enthaltende Lösung. Für die Kernstruktur der Angiospermen und der Sporenbildung der Pilze wird folgende Behandlung eingeschlagen: Die Gegenstände werden in eine Lösung von je 1 g Trichloressigsäure und Eisessig in 8 g absolutem Alkohol eingetragen. Nach 12—24 Stunden werden sie in absoluten Alkohol übertragen, der nach 3 Stunden einmal gewechselt wird. Nach wieder 3 Stunden kommen die Stücke auf 3 Stunden in Xylol. Darauf werden sie 12 Stunden bei + 50° C in eine 50proz. Lösung von Paraffin in Xylol eingelegt, dann 12 Stunden in Paraffin. Darauf kann man einbetten und schneiden.

Unveränderte Fixierung von Kernen erhält man mit einem Gemisch von 1 Teil physiologischer Kochsalzlösung und 80 Teilen Formol, für Meeresalgen nimmt man Meerwasser statt der physiologischen Kochsalzlösung, für Gewebe höherer Pflanzen statt ihrer 7,5proz. Rohrzuckerlösung (Noel u. Mangenot[2]).

Allens-Modifikation der Bouinschen Lösung: Gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung 75 ccm, Formol (Handelsware) 25 ccm, Eisessig 5 ccm, Harnstoff 2 g, Chromsäure 1,5 g.

Die Objekte werden in die auf 38° erhitzte Flüssigkeit eingelegt. Auswaschen in 75proz. Weingeist, der Lithiumkarbonat (im Original einige Tropfen (!) Lithiumkarbonat) enthält. Färben nach Heidenhain u. dgl. (Latter[3]).

Die Bouinsche Fixierung wurde auch von Lenoir[4]) abgeändert. Er verwendet ein frisch bereitetes Gemisch von 4 Teilen Lösung 1 und 1 Teil Lösung 2.

[1]) J. Hofker, Die Trichloressigsäure als Fixierungsmittel, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1921, XXXVIII, S. 130.

[2]) R. Noel u. G. Mangenot, Le formol, fixateur nucléaire, Compt. rend. soc. Biol, 1922, LXXXVII, S. 1130.

[3]) J. Latter, The pollen development of Lathyrus odoratus, Ann. of Bot., 1926, XL, S. 277.

[4]) M. Lenoir, Fixation par le Picroformol acétique de Bouin modifié. Methode modifiée de differentiation des chromatines nucléaires par l'Hématoxyline et le Safranine. Compt. rend. soc. biol., 1929, CI, S. 1203; Ref. Bot. Zentralbl., 1930, N. F. XV, S. 480.

Lösung 1: 100 ccm 40proz. Formalin werden mit einer Aufschwemmung von 1 Teil Kalziumkarbonat und 3 Teilen Wasser neutralisiert. Die Lösung wird bei 40—50° mit Pikrinsäure gesättigt und erkalten gelassen. Lösung 2: Ein Gemisch von 1 Teil Eisessig und 3 Teilen Wasser wird bei 40—50° mit Pikrinsäure gesättigt und erkalten gelassen. Die Gegenstände können 1—2 Tage oder länger in der Fixierungsflüssigkeit bleiben. Nachher Doppelfärbung mit Hämatoxylin-Safranin.

Chevalier[1]) verwendet an Stelle von Regauds Fixiermittel IV B, das die Färbbarkeit der Kerne ungünstig beeinflußt, grünes oder violettes Chromazetat 1. Wasser 8 Teile, grünes Chromazetat (20 Baumé) 1 Teil, 12proz. Kaliumdichromat 2 Teile, 40proz. neutrales Formol (zuletzt hinzufügen) 1 Teil. 2. 4proz. Chromazetat violett 5 Teile, Ammoniumdichromat 2 Teile, gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung 4 Teile, 40proz. Formol 4 Teile. Fixierung 4 Tage, 1 Woche bis einen Monat Nachchromierung in derselben Flüssigkeit ohne Formol, Auswaschen, Entwässerung, Färben mit Hämatoxylin.

Alsterberg[2]) fixiert mit Bromzyan, indem er den auf dem Objektträger befindlichen Gegenstand über den Hals einer mit wässeriger Bromzyanlösung gefüllten Flasche hält. Jodzyan wirkt schwächer.

Kuhn[3]) verwendet zur Fixierung der Kerne von Thalictrum (mit nachfolgender Färbung durch Heidenhains Eisenhämatoxylin) Nawaschins Gemisch: 1proz. Chromsäure 1 Teil, 40proz. Formol 4 Teile, Eisessig 1 Teil.

Zur gleichzeitigen Fixierung von Kernen und Mitochondrien empfiehlt Zirkle[4]) 1. Kupferdichromat 5 g, Kupferoxyd 1 g, 10proz. Essigsäure 1 ccm, Wasser 200 ccm. Einwirkung 36 Stunden bis 6 Tage. Färbung mit Heidenhains Hämatoxylin. 2. Chromtrioxyd 5 g, Glucinkarbonat 3 g, Wasser 200 ccm. 3. 10proz. Chromsulfat 1 Teil, 8proz. Formalin neutralisiert mit einem Überschuß von $CaCO_3$ oder Li_2CO_3 1 Teil.

Bei zu großem Säuregehalt wird nur das Chromatin, bei zu geringem werden nur die Mitochondrien fixiert.

Sakamura[5]) fixiert Chromosomen mit siedendem Wasser.

Zur Untersuchung der Chromosomen in Pollenmutterzellen hat Belling[6]) ein besonderes Verfahren ausgearbeitet. Zur Fixierung ver-

[1]) P. Chevalier, Note sur l'emploi de l'acetate chromique dans la technique cytologique, Rev. gén. bot., 1927, XXXIX, S. 65; Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk. 1928, XLV, S. 248.

[2]) G. Alsterberg, Über die Verwendung der Halogenzyanide in mikroskopischer Praxis, Protoplasma, 1927, II, S. 376.

[3]) E. Kuhn, Zur Zytologie von Thalictrum, Jahrb. wiss. Bot., 1928, LXVIII, S. 382.

[4]) C. Zirkle, Some fixatives for both nuclei and mitochondria, Science, 1927, LXVI, S. 400, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1928, XLV, S. 111.

[5]) T. Sakamura, Fixierung von Chromosomen mit siedendem Wasser, Bot. Mag. Tokyo, 1927, XLI, S. 59, Bot. Zentralbl., 1927, XI, S. 252.

[6]) J. Belling, A method for the study of chromosomes in pollen-mothercells, Univ. California Public. Bot., 1928, XIV, S. 293; Ref. in Bot. Zentralbl., 1930, N. F. XV, S. 451.

wendet er eine frisch bereitete Mischung gleicher Teile folgender Lösungen: A (5 g Chromsäure, 50 ccm Eisessig und 320 ccm Wasser), B (200 ccm Formalin + 175 ccm Wasser oder 100 ccm Formalin + 275 ccm Wasser). Zur Färbung wird eine Lösung von 0,5 g Brasilin in 100 ccm 70proz. Weingeist verwendet.

Flechten fixiert W. Nienburg (Entwickl. einig. Flechtenapothecien, Flora, 1908, XCVIII, 1) mit 1proz. Chromessigsäure (12 Stunden, dann 24stündige Auswaschung in fließendem Wasser) und färbt mit *Hämatoxylin Heidenhain* (mehrere Stunden). „Als Gegenfärbung zur Deutlichmachung der Membranen wurde häufig Eosin benutzt".

Es sei nochmals betont, daß im vorstehenden nur die Vorschriften einiger Fixier- und Färbungsmittel gegeben und Literaturangaben meist fortgelassen werden mußten. Es muß auf die Speziallliteratur verwiesen werden (Lee, P. Mayer u. a.) und auf die Referate von E. Küster in der Ztschr. f. wiss. Mikr. Die Lösungen (oder die Tabletten hierzu) sind auch von Grübler, Kahlbaum u. a. zu beziehen.

Über die Zellkerne der Hefezellen und Bakterien siehe die Kapitel „Mikrochemisches über Hefe" und „Zur Mikrochemie der Bakterien".

Die Chromatophoren der höheren Pflanzen

Chromatophoren sind Organe des Protoplasten, welche entweder Farbstoffe führen oder Farbstoffe zu bilden befähigt sind. Es sind weiche plasmatische Körper, die nur den Pilzen fehlen. Wir unterscheiden Leukoplasten, Chloroplasten und Chromoplasten (Schimper), die im Laufe ihrer Entwicklung ineinander übergehen können.

Das aus einer körnigen Grundsubstanz bestehende, außen durch eine nichtkörnige Schicht begrenzte Stroma umschließt eine Höhlung (Vakuole), in der die Stärkeeinschlüsse auftreten (Zirkle).

Mereschkowsky[1]) u. Famintzin haben die Theorie aufgestellt, daß die Chromatophoren der Pflanzen ursprünglich selbstständige Organismen (Algen) waren.

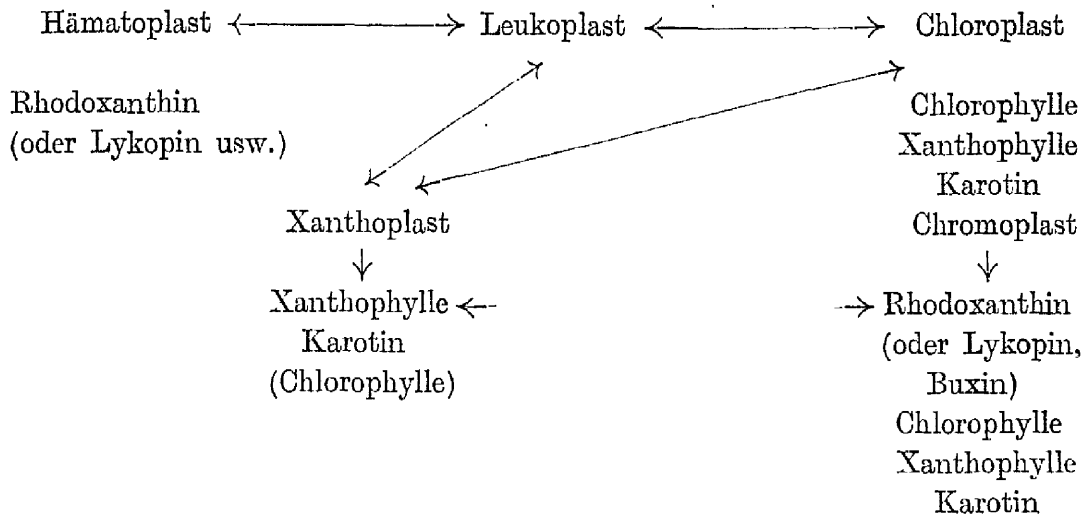
Geitler[2]) glaubt nachgewiesen zu haben, daß die chromatophoren-artigen Gebilde von Glaucocystis und Glocochaete, morphologisch genommen, selbständige Organismen, und zwar Schizophyceen sind.

Pascher[3]) hält die prinzipielle Richtigkeit der Famintzin-Mereschkowskyschen Theorie für erwiesen, nicht aber ihre Allgemeingültigkeit.

[1]) O. Mereschkowsky, Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreich, Biol. Zentralbl., 1905.

[2]) L. Geitler, *Der Zellbau von Glaucocystis Nostochinearum und Gloechaete* Wittrockiana und die Chromatophoren-Symbiosetheorie von Mereschkowsky, Arch. f. Protistenkunde, 1923, XLVII, S. 1.

[3]) A. Pascher, Bemerkungen zur Chromatophorentheorie Famintzin-Mereschkowskys, Jahrbücher f. wiss. Bot., 1929, LXXI, S. 454.

Die Chromoplasten unterscheiden sich nach Lippmaa[1]) von den Chloroplasten dadurch, daß sie außer den in den Chloroplasten vorkommenden Farbstoffen noch „Hämatokarotinoide“ (Rhodoxanthin, Buxin, Lykopin) enthalten. Das weitere ergibt sich aus dem nachstehenden Schema, in welchem Hämatoplasten Plastiden bedeuten, die Hämatokarotinoide ohne Chlorophylle und Xanthokaritonoide enthalten, während Xanthoplasten besondere Plastiden sind, die in etiolierten Pflanzenteilen und im herbstlich vergilbten Laube auftreten.

Die Chloroplasten der Algen sind Scheiben, Bänder, Sterne und nehmen einen großen Teil des Zellumens ein. Bei höheren Pflanzen finden wir kleine rundliche oder linsenförmige Körner, Chlorophyllkörner (Fig. 156). — Die Chlorophyllbildung (das Ergrünen) ist von verschiedenen Faktoren abhängig (chemische Stoffe, S. 195, günstige Temperatur, Luftsauerstoff, Lichtintensität u. a.). Die Lichtintensität kann sehr niedrig bemessen sein. Im allgemeinen geht die Fähigkeit, Chlorophyll bei Lichtabschluß zu bilden, mit der höheren Organisationsstufe der Pflanzen verloren. In den mit dem lebenden Plasma in Verbindung stehenden Chlorophyllkörnern vollzieht sich die Photosynthsee (S. 212 u. 292). Bei den saccharophyllen Pflanzen werden die Hexosen ständig abgeleitet, gewöhnlich erfolgt aber eine Überführung dieser in Stärke; es entstehen in den Chlorophyllkörnern kleine Stärkekörnchen (Stärkeeinschlüsse, s. d.). Dadurch werden Störungen im Assimilationsprozeß vermieden, die Konzentration des Zellsaftes nimmt ab u. a. In der Nacht wird die Assimilationsstärke abgeleitet, am frühen Morgen sind die Blätter stärkefrei.

Außer Stärke bilden die Chloroplasten während der Assimilation, wie schon Nägeli beobachtete, Tröpfchen, das Assimilationssekret. Arthur Meyer[2]) hat zu zeigen versucht, daß in ihm der von Curtius u. Franzen[3]) als allgemeiner

[1]) Th. Lippmaa, Über den vermuteten Rhodoxanthingehalt der Chloroplasten, Ber. deutsch. bot. Ges., 1926, XLIV, S. 643.

[2]) Arthur Meyer, Das während des Assimilationsprozesses in den Chloroplasten entstehende Sekret, Ber. deutsch. bot. Ges., 1917, XXXV, S. 586; Derselbe, Die chemische Zusammensetzung des Assimilationssekretes, ebenda S. 674,

[3]) Th. Curtius u. H. Franzen, Über den Blätteraldehyd, Liebigs Annalen 390, 89 (1912).

Blattbestandteil nachgewiesene α-β-Hexylenaldehyd vorhanden ist, vgl. a. S. 334.

Lebende Chlorophyllkörner reduzieren Silbersalze (¼-—1proz. Lösung von Silbernitrat) im Dunkeln und können in Zweifelsfällen (sehr kleine, hellgrün gefärbte Chlorophyllkörner vieler Epidermiszellen) dadurch nachgewiesen werden. Die Reduktion erfolgt — entgegen Czapek — nur durch die lebenden Chlorophyllkörner (Molisch)[1]). (H. Molisch, Beiträge zur Mikrochemie der Pflanze, Nr. 16; Zur Silberreduktion der Chlorophyllkörner, Ber. deutsch. bot. Ges., 1921, XXXIX, S. 136).

Die Chloroplasten (Chlorophyllkörper) führen in einem farblosen eiweißhaltigen Stroma einen grünen Farbstoff (Chlorophyll), der bei Algen oft durch andere Farbstoffe verdeckt ist.

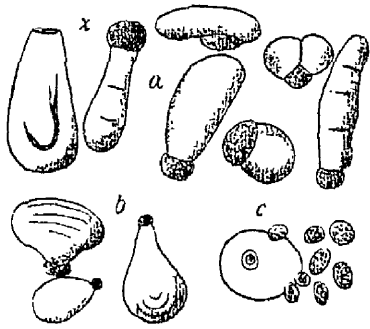



Fig. 156. Leukoplasten an Stärkekörnern, *a*) Iris germanica (Rhizom, bei *x* Leukoplast zugrunde gegangen), *b*) Ferula spec. (Wurzel). *c*) Leukoplasten am Zellkern, Orchis spec. (Knospenblatt) (Tunmann)

Die intakten Chloroplasten junger Pflanzen besitzen flüssige Konsistenz, die ausgewachsenen gallertartige, werden aber nach Aufnahme von Wasser flüssig. Sie sind mikroskopisch homogen oder enthalten höchstens Körnchen und Tröpfchen. Die von früheren Forschern angegebenen Netz-, Kammer- oder Schwammstrukturen werden durch die Fixierungsmittel hervorgerufen[2]).

Unter der Einwirkung extremer meteorologischer Faktoren (Temperatur und Besonnung) können die Plastiden einiger Pflanzen den Zustand ihrer kolloidalen Bestandteile so stark ändern, daß sie ihre Widerstandsfähigkeit einbüßen und in wässerigen Lösungen unter Verlust des scharfen Umrisses ihrer Konturen rasch aufquellen (Alexandrov)[3]).

Biedermann[4]) schließt aus seinen Versuchen an den Blattzellen von Elodea, daß die Chloroplasten reichlich lipoide Substanzen enthalten, die zu dem Chlorophyllfarbstoff in naher Beziehung stehen. Derselbe stellte weiter fest, daß die Chlorophyllkörner, wie auch das

[1]) H. Molisch, Das Chlorophyllkorn als Reduktionsorgan, Sitzgsber. Wiener Akad. Wiss. Math. naturw. Kl., Abt. I, 1918, CXXVII, S. 470.

[2]) W. W. Lepeschkin, Über das Protoplasma und die Chloroplasten von Bryopsis plumosa, Ber. deutsch. bot. Ges., 1926, XLIV, S. 21.

[3]) W. G. Alexandrov, Zustand und Tätigkeit der Chloroplasten bei verschiedenen klimatischen Bedingungen, Protoplasma, 1929, VI, S. 429.

[4]) W. Biedermann, Mikrochemische Beobachtungen an den Blattzellen von Elodea, Flora 1918, N. F. 11 u. 12, S. 560.

Plasma desselben Materials von Pepsinsalzsäure nicht verdaut werden; dagegen wurden sie von Trypsin (in 0,5proz. Sodalösung) auch in den geschlossenen Zellen verdaut, wenn die Präparate erst plasmolysiert und dann mit Weingeist ausgezogen oder mit Schwefelsäure behandelt wurden. Außer dem lipoidartigen Bestandteil ist noch ein farbloses, mit Wasser quellbares Hydrokolloid vorhanden, das in Fettlösungsmitteln unlöslich ist.

Leukoplasten (Fig. 156) sind farblose, meist kugelige Gebilde, aus denen die Chromatophoren hervorgehen. In Reservestoffbehältern bleiben sie farblos und bilden aus gelösten Polysacchariden Stärke (Amyloplasten). Es sind zarte Gebilde; in Drogen und Herbarmaterial trifft man sie oft nicht mehr an. Zuweilen läßt sich an den Stärkekörnern die Stelle ihres Sitzes erkennen (flache Mulde, Iriswurzeln, Fig. 156 a). In Blattepidermen und Trichomen treten oft durch Rückbildung aus Chloroplasten entstandene Leukoplasten auf. Von den Leukoplasten (Orchis, Arum, Tradescantia, Galanthus u. a.) sagt Zacharias: „sie verquellen in verdünnter Salzsäure, Methylgrünessigsäure; desgleichen bis auf geringe Reste in Magensaft, 10proz. Kochsalzlösung und destilliertem Wasser. Sie färben sich in Methylenblau-Fuchsin S rot nach Behandlung mit verdünnter Salzsäure. Sie quellen nicht und färben sich blau in Glaubersalz-Methylgrünessigsäure" (Lit. S. 775, 2).

Zum Nachweis der in vivo nicht sichtbaren farblosen Dunkelform der Leukoplasten verwendet Ch. Ternetz[1]) folgendes Verfahren: Abtötung jugendlicher Kulturen durch Os_3O_4; Zentrifugieren, Waschen. 24 Stunden fixieren in Sublimat (konzentrierte weingeistige Lösung von $HgCl_2$ 50 ccm, Wasser 20 ccm); evtl. ebensolange in Jodalkohol; Auswaschen in Wasser, 24—48 Stunden in Nigrosin (sehr verdünnte, mit Schwefelsäure angesäuerte Lösung) oder Gentianaviolett (stark verdünnte wässerige Lösung) unter gelindem Erwärmen. Auswaschen, vorsichtiges Differenzieren in verdünntem Weingeist, dann durch Xylol in Kanadabalsam.

Chromoplasten führen gelbe bis rotgelbe Farbstoffe (Xanthocarotine) und entstehen entweder aus Leukoplasten (in unterirdischen Organen, Daucus) oder, wie bei der Reife der Früchte, in und an sich zersetzenden Chlorophyllkörnern. In Pflanzen wärmerer Länder treten Chromoplasten auch in vegetativen Organen auf (W. Rothert, Bull. Ac. Cracovie, 1912, 189). Bei der Ernährung spielen sie keine Rolle. Die Karotinbildung in Früchten ist ein Prozeß, der normalerweise bedingt wird durch abgeschlossenes Wachstum, Aufhören der Ernährung und Zersetzung des Chlorophylls. In Daucus wächst der Gehalt an Karotin um-

[1]) Ch. Ternetz, Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Euglena gracilis Krebs, Jahrb. wiss. Bot., 1912, LI, S. 435.

gekehrt proportional dem an Chlorophyll, proportional dem an Stärke und Zucker (F. u. G. Tobler). Bei der enzymreichen Monilia sitophila betrachtet Went reichliche Carotinbildung als Schutz für die Enzyme (Rec. trav. bot. Néerl., 1904, I, S. 106). Die Bildung des Carotins (Hämatochrom) bei Trentepohlia hängt von der Feuchtigkeit ab. Bei Trockenheit vermehrt sich der Farbstoff, füllt den ganzen Zellinhalt aus und verdeckt die Chromoplasten (K. Meyer, Lebensgesch. d. T. umbrina Mart., Bot. Ztg., 1909, LXVII, S. 25). Die Chromoplasten bedingen die grellen Lockfarben der Blüten und Früchte. Orange- bis karminrote Chromoplasten finden sich in Caps. ann., Convall. majal., Lycopers. escul., Asparag. off., Crataeg., Rosa (Hypanthien), Evonymus, Myristica, Taxus (Arillus). Gelbe Chromoplasten kommen vor in vielen Blüten (Verbascum, Calendula, Matricaria, Gentiana, Cheiranthus, in den Blütenhaaren der Cucurbitaceen) und in Früchten (Aurantiaceen).

Rote und rotbraune „unregelmäßig klumpige oder lappige Gebilde", die den Chromatophoren nahestehen sollen, hat A. Schlockow (Anat. d. braun. Blüt., Diss. Heidelberg, 1903, S. 22) in den braunen Blüten von Oncidium sphacelatum aufgefunden und sagt, daß sie „weder in kaltem noch in heißem Wasser löslich sind, daß sie weder von kaltem noch von heißem Alkohol, noch von kalter oder heißer Salzsäure angegriffen werden, daß sie dagegen von Natronlauge und von Ammoniak schon in der Kälte leicht gelöst werden. Hierbei verschwindet aus ihnen zuerst der rote Farbstoff und es hinterbleibt ein farbloses Bläschen."

Anfangs nahm man an, daß die Chromatophoren durch Neubildung aus dem Zellplasma entständen (Mikosch) und sich dann durch Teilung vermehren. Da sich aber sehr kleine Leukoplasten schon in der Eizelle und in den Vegetationspunkten vorfanden, so vertraten Schmitz, Schimper und A. Meyer die Ansicht, daß sich sämtliche Chromatophoren einer Pflanze nur von den Leukoplasten der Eizelle ableiten und diese wiederum von der Mutterpflanze. Von verschiedener Seite wurde hiergegen Einspruch erhoben, Eberdt (Jahrb. wiss. Bot., 1891, XXII, S. 293) kam zu dem Ergebnis, „daß die Schimperschen Stärkebildner nicht schon in den Zellen des Vegetationspunktes vorhanden sind".

Aber Sapěhin[1]) fand bei den Laubmoosen in der Spore, dem Protonema, der Scheitelzelle des jungen und älteren Stengels, während der Ovo- und Spermatogenese, im Embryo und seiner Scheitelzelle, im Archegonium und wieder in der Spore stets Chromatophoren vor, die nur durch Teilung auseinander hervorgingen; analog ist das Ergebnis von Scherrers[2]) Versuchen mit Anthoceros: die Chromatophoren von Anthoceros bleiben während der ganzen Entwicklung des Gameto- und Saprophyten als morphologische Individualitäten erhalten; ihre Vermehrung geschieht ausschließlich durch Teilung.

Die Chromatophoren sollen nach der Ansicht mancher Forscher aus festeren Teilen des Cytoplasmas hervorgehen, aus Chondrio-

[1]) A. A. Sapěhin, Untersuchungen über die Individualität der Plastide, Ber. deutsch. bot. Ges., 1913, XXXI, S. 14.

[2]) A. Scherrer, Untersuchungen über Bau und Vermehrung der Chromatophoren und das Vorkommen von Chondriosomen bei Anthoceros, Flora, 1915, N. F., VII, S. 1.

somen (die Chondriosomen sollen den Mitochondrien der Tierzelle homolog sein). Diese Jugendstadien wurden schon von K. Mikosch (Sitzgsber. Wien. Ak., 1878) bei Allium, Galanthus u. a. beschrieben, sie sind identisch mit den Granulis von Zimmermann, und wurden in neuerer Zeit eingehend studiert von Pensa, Guilliermond, Forenbacher (Tradesc. virg.), H. Lundegårdh (Wurzelspitzen), Vicia), Lewitsky (Helodea) u. a.

Es ist aber fraglich, ob die Chondriosomen die verschiedenen Entwicklungsstadien der Chromatophoren darstellen, wie Schmidt[2]) meint, ja ob sie überhaupt sämtlich mit den Chromatophoren in Zusammenhang stehen. Selbst in ausgewachsenen Zellen finden wir neben voll entwickelten Chlorophyllkörnern auch Chondriosomen, sowohl in Körnern (Mitochondrien) als auch in Fäden (Chondriomiten) und in Stäbchen (Chondriokonten). Ein besonders eifriger Verteidiger der Identität von Chondriosomen (Mitochondrien) und Plastiden ist Guilliermond[1]).

Es kann nicht die Aufgabe dieses Buches sein, zu diesen Streitfragen Stellung zu nehmen. Bemerkt sei nur, daß (s. oben) nach Untersuchungen von Sapěhin an Laubmoosen und denen von Scherrer an Anthoceros bei diesen Pflanzen keinerlei genetischer Zusammenhang zwischen Chondriosomen und Chromatophoren besteht und daß nach Kassmann[2]) bei Cabomba zwischen beiden Gebilden Beziehungen nur insofern bestehen, als mit dem Beginn der Chloroplastenbildung und dem Auftreten des Chlorophylls die Chondriosomen verschwinden.

Auf Grund seiner Untersuchungen an Phanerogamen (Elodea canadensis, Pelargonium zonale, Impatiens parviflora) kommt Noack zu dem Ergebnis, daß die Plastiden nicht durch Umbildung aus Chondriosomen entstehen, sondern als selbständige Zellorgane neben und unabhängig von den Chondriosomen aufzufassen sind.

In 30proz. Essigsäure werden die Chondriosomen bis zur Unkenntlichkeit deformiert, die Plastiden bleiben vollkommen erhalten. In 10proz. Ammoniak verquellen die Chromatophoren, manchmal bis zur völligen Unkenntlichkeit, die Chondriosomen bleiben dauernd gut unterscheidbar. 2proz. Kalilauge löst die Chondriosomen sofort auf, die Plastiden verquellen, werden aber innerhalb 2 Stunden nicht gelöst.

[1]) A. Guilliermond, Nouvelles remarques sur la signification des plastes de W. Schimper par rapport aux mitochondries actuelles, Compt. rend. soc. biol. Paris, 1913, LXXV, S. 436. Derselbe, Nouvelles remarques sur les plastes des végétaux. Evolution des plastes et des mitochondries dans les cellules adultes, Anatomischer Anzeiger, 1914, XLI, S. 566.

[2]) F. Kassmann, Die Entwicklung der Chondriosomen und Chromatophoren bei Cabomba aquatica und Cabomba caroliniana, Inaug.-Diss., Münster, 1926 u. Planta, 1926, I, S. 624.

Friederichs[1]) kam unter Anerkennung der Resultate von Sapěhin u. Scherrer zu dem Schluß, daß in den meristematischen Zellen der Adventivwurzelspitze, des Sproßscheitels, sowie der basalen Streckungszone der jüngeren Blätter von Helodea eine Umwandlung von Chondriosomen in Chromatophoren erfolge.

Arthur Meyer[2]) beschreibt die Chondriosomen unter der Bezeichnung Allinante und versteht unter diesen „nichtkristallinische, weiche ergastische Eiweißante des Cytoplasmas, welche aus Eiweißkörpern bestimmter mikrochemischer Reaktion, aus Allin, bestehen"[3]). Charakteristisch für diese Eiweißkörper ist, daß sie in zweiprozentiger Kalilauge löslich, in Säuren unlöslich sind. Sie werden durch Pepsin bei 40° nicht, durch Trypsin bei 20° schwer angegriffen. Die Eiweißkörper, der Allinante der Monokotyledonen und Moose enthalten — als „Eisennukleine" — durch Schwefelammonium nachweisbares Eisen, die der Dikotyledonen nicht.

Der Aggregatzustand der Chondriosomen oder Mitochondrien der lebenden Zelle ist nach Guilliermond[4]) der halbflüssige. Mit Jodlösung färben sie sich gelb, mit Osmiumsäure grün bei nachfolgender Behandlung mit Pyrogallol. Essigsäure oder Weingeist enthaltende Flüssigkeiten rufen eine künstliche, granulös-alveoläre Struktur des Plasmas hervor und dürfen deshalb nicht zur Fixierung verwendet werden. Brauchbar sind Chromosmiumsäure, Osmiumsäuredämpfe, Formol allein oder im Gemisch mit Kaliumdichromat. Elektivfärbung mit Eisenhämatoxylin, Säurefuchsin oder Kristallviolett.

Über Fixierung und Färbung von Chondriosomen besteht eine riesige Literatur, aus der hier nur einiges mitgeteilt werden kann.

Lewitsky teilt die Fixierungsmittel in „chondriosomerhaltende" und „chondriosomenzerstörende" ein. Zu ersteren zählen außer der Bendaschen Mischung noch 10proz. Formalin, ½proz. Osmiumsäure, schwaches Flemmingsches Gemisch, Altmannsches Gemisch (gleiche Teile 5% Kaliumdichromat und 2% Osmiumsäure), zu den letzteren u. a. Alcohol absolutus.

Chondriosomenzerstörende Fixierungsmittel

Bouin: 15 (20) ccm gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung, 5 (30) ccm käufliches Formol und 1 (5) ccm Eisessig. Einwirkung

[1]) G. Friedrichs, Die Entstehung der Chromatophoren aus Chondriosomen bei Helodea canadensis, Jahrbücher f. wiss. Bot., 1922, LXI, S. 430.

[2]) A. Meyer, Morphologische und physiologische Analyse der Zelle usw. S. 114.

[3]) Unter Ant versteht A. Meyer ein mikroskopisch kleines Massenteilchen von beliebiger Gestalt, Zusammensetzung und Konsistenz; „Allin" offenbar nach Allium cepa, an dem die erste Untersuchung ausgeführt wurde.

[4]) A. Guilliermond, La structure de la cellule végétale (Memorial publication in honour of the birthday of T. G. Mendel, Prague, 1925, S. 146; Ref. in Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1925, XLII, S. 475.

12 Stunden, Auswaschen mit 70proz. Weingeist, bis dieser nicht mehr gelb gefärbt.

Lenhossek: 75 ccm gesättigte wässerige Sublimatlösung, 20 ccm absoluter Alkohol, 3 ccm Eisessig. Fixierungsdauer 12 Stunden. Auswaschen mit 70proz. Weingeist, der einigemal gewechselt wird. Dann einige Minuten in 90proz. mit wenig Jod (zur Entfernung des Quecksilbers) versetzten Weingeist. Zwischen Alkohol und Paraffin Chloroform.

Zur Kennzeichnung der Chondriosomen dient vielfach das Bendasche Verfahren. Es wird hier so wiedergegeben, wie es Scherrer bei Anthoceros anwandte. Die frischen Objekte kommen 1—2 Stunden zur Fixierung in Bendasche Flüssigkeit: 15 Vol. 1proz. (bei zarten Gegenständen ½proz.) Chromsäure, 4 Vol. 2proz. Osmiumsäure, 3—5 Tropfen Eisessig. Nach kurzem Auswaschen Nachchromierung (kann auch wegfallen) durch 24stündiges Einlegen in ein Gemisch gleicher Teile rektifizierten Holzessigs und 1proz. Chromsäure und weitere 24 Stunden in eine 2proz. Kaliumdichromatlösung. Dann 24stündiges Auswaschen am besten in fließendem Wasser. Paraffindurchtränkung mit Xylol als Überführungsmedium. Aufkleben auf Deckgläschen mit Eiweißglyzerin. Die vom Paraffin befreiten 5—10 μ dicken Schnitte wurden in Wasser überführt, 24 Stunden in einer 4proz. Lösung von Eisenalaun gebeizt und nach Abspülen in destilliertem Wasser in eine hellgelbe wässerige Lösung von alizarinsulfosaurem Natrium (Kahlbaum), 1 ccm einer gesättigten Lösung in 70proz. Weingeist auf 80—100 ccm Wasser, übertragen. Abspülen mit destilliertem Wasser. Je zwei Objektträger mit den Präparaten wurden dann in einer viereckigen flachen Schale in die zur Hälfte mit destilliertem Wasser verdünnte Bendasche Kristallviolettlösung (Grübler) gebracht und diese sorgfältig bis zur Dampfbildung erwärmt. Die von überflüssigem Farbstoff mit Wasser befreiten Schnitte wurden unter mikroskopischer Kontrolle 1—2 Minuten in 30proz. Essigsäure differenziert, letztere mit Wasser ausgewaschen. Die trockenen Präparate wurden nach kurzem Eintauchen in absoluten Alkohol und Bergamottöl in Xylol übertragen und in säurefreiem Kanadabalsam eingeschlossen. Chondriosome violett, Cytoplasma und ruhender Kern rötlichbraun.

Okawa[1]) hat als Fixierungsmittel für die Chondriosomen von Elodea folgende bewährt gefunden: 1. Methode Regaud IV. Man fixiert 4 Tage mit 3proz. Kaliumdichromat 80 Teile, käufliches Formol 20 Teile; Nachchromierung in 3proz. Kaliumdichromat 8—15 Tage. 2. Methode Tupa. Auf 80 ccm Regaud IV 1 g Urannitrat; 24stündige Fixierung. 3. Methode Helly. Wasser 100 g, Kaliumdichro-

[1]) Y. Okawa, A propos des fixateurs du chondriome, Rev. gén. bot., 1927, XXXIX, S. 218.

mat 5 g, Sublimat 3 g, dazu kurz vor Gebrauch 10 % Formol (40 prozentig). Nach der Fixierung 48stündiger Aufenthalt in heiß bereiteter gesättigter Lösung von Kaliumdichromat.

Silberimprägnationsmethode von Achúcarro u. Rio-Hortega[1]) 1. Variante. 1. Fixierung in 10proz. Formol während 5—6 Tagen. 2. Einbetten in Celloidin. 3. Behandlung der Schnitte bei 50° mit 3proz. wässeriger Tanninlösung. 4. Waschen in verdünntem Ammoniak. 5. Imprägnierung der Schnitte in einer verdünnten ammoniakalischen Silberlösung von Bielschowsky. 6. Waschen in destilliertem Wasser. 7. Vergolden der Schnitte bei 50° mit Goldchlorid 1 : 500. 8. Fixieren der Schnitte in konz. Fixiernatronlösung. 9. Aqua destillata, Weingeist, Kreosot (besser Karbol-Xylol-Kreosot) Kanadabalsam.

Methode Champy-Kull von Maximow[2]) für die tierische Zelle empfohlen. Die Gegenstände werden 24—48 Stunden in Champyscher Flüssigkeit fixiert: Chromsäure (1 %) 7 Teile, Kaliumdichromat (3 %) 7 Teile, Osmiumsäure (2 %) 4 Teile. Hiernach Waschen mit Wasser und 24stündige Behandlung mit Holzessig 1 Teil, Chromsäure (1 %) 2 Teile.

Färbung nach Kull[3]) (Modifikation der Altmannschen Methode). 1. Färben unter Erhitzen bis zur Dampfbildung mit dem Altmannschen Säurefuchsein (20 g Säurefuchsin Grübler, 100 ccm Anilinwasser). 2. Nach Abkühlen Abwaschen mit destilliertem Wasser. 3. 1—2 Minuten in gesättigte wässerige Thioninlösung (0,5 g Thionin, 100 ccm Wasser) oder 0,5proz. wässerige Toluidinblau-Lösung. 4. Abspülen mit destilliertem Wasser. 5. 20—40 Sekunden Differenzieren mit 0,5proz. Lösung von Aurantia in 70proz. Weingeist. Kontrolle mit dem Mikroskop. 6. 96proz. Weingeist. 7. Absoluter Alkohol. 8. Xylol. 9. Balsam.

Will beim Differenzieren die blaue Farbe nicht weichen, so muß man nicht zu lange mit Thionin färben oder beim Differenzieren erst kurz Aurantia anwenden, dann 96proz. Weingeist, dann wieder Aurantia.

Chondriosomen rot, Stärkekörner blau, Cytoplasma gelb.

Als beste Fixierungsmethode erwies sich nach Noack[4]) die Sapěhinsche Modifikation des Regaudschen Verfahrens. Die Objekte kommen unter täglicher Erneuerung der Fixierungsflüssigkeit auf vier Tage in ein Gemisch gleicher Volumina von 10proz. Formol und

---

[1]) Rio-Hortega, Nuevas reglas para la coloración constante de las formaciones conectivas por el método de Achúcarro, Trab. del Lab. de Invest. biol. de la Universidad de Madrid, 1916, XIV. — S. Alvarado, Die Entstehung der Plastiden aus Chondriosomen in den Paraphysen von Mnium cuspidatum, Ber. deutsch. bot. Ges., 1924, XLI, S. 85.

[2]) A. Maximow, Sur les méthodes de fixation et de coloration des chondriosomes, Compt. rend. soc. biol., Paris, 1916, LXXIX, S. 462; Sur la structure des chondriosomes, ebenda S. 465.

[3]) H. Kull, Eine Modifikation der Altmannschen Methode zum Färben der Chondriosomen, Anatom. Anzeiger 1913, XLV, S. 153; Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1914, XXXI, S. 243.

[4]) K. L. Noack, Untersuchungen über die Individualität der Plastiden bei Phanerogamen, Zeitschr. f. Bot., 1921, XIII, S. 1.

2proz. Kaliumdichromat; sechstägige Nachbehandlung mit 2proz. Kaliumdichromat; nach mehrstündigem Wässern in steigenden Weingeist. Bei kleinen Pflanzenteilen genügte häufig 24stündige Fixierung mit Formalin-Kaliumdichromat und 48stündige Nachbehandlung mit Kaliumdichromat.

Die besten Bilder ergab das Altmannsche Säurefuchsin-Verfahren.

Mascré[1]) fixiert mit 20proz. Formalin, das entweder 3 % Monochlor- oder Cyanessigsäure oder 2 % Trichloressigsäure enthält. Nachchromierung überflüssig. 6stündige Behandlung mit 3proz. Eisenalaun, 12stündige mit Hämatoxylin.

Guilliermond[2]) erzielt Vitalfärbung von Chondriosomen mit Dahliaviolett und Janusgrün besonders bei Pilzen.

Die Chondriome einer Saprolegnia geben die Reaktionen des Glutathions (s. S. 289), reduzieren Chromsäure, färben eine gesättigte Lösung von m-Dinitrobenzol in 70proz. Weingeist gelb und oxydieren Metol, Pyrogallol u. a.

Joyet-Lavergne[3]) weist die Chondriome der Gregarineen durch deren oxydierende und reduzierende Wirkung nach. Zum Nachweis der oxydierenden Wirkung verwendet er: 1. 2proz. wässerige Lösung von Diamidophenol oder Pyrogallol, 2. 2proz. Lösung von Metachinon oder p-Phenylendiamin in 50proz. Weingeist, 3. Formol 10, Natriumsulfit 1, Hydrochinon 1, Wasser 100.

Für die reduzierende Wirkung 1. 1proz. Lösung von Goldchlorid, 2. eine mit dem 20fachen Wasser verdünnte gesättigte Lösung von Pikrinsäure, 3. Kaliumpermanganat 1 : 20 000, 4. 1proz. Chromsäure, 5. gesättigte Lösung von m-Dinitrobenzol in 70proz. Weingeist.

Diese Reaktionen können auch bei anderen Pflanzen angewandt werden.

Zum Studium der feineren Struktur der Chromatophoren ist die Beobachtung lebenden Materials erforderlich. Dabei müssen alle Faktoren ausgeschaltet werden, die das Leben der Protoplasten und der Chromatophoren schädigen. Man wählt zur Beobachtung stärkere Präparate (wenn geeignet Trichome oder dünne Blätter) und beobachtet sofort in Rohrzuckerlösung (2—5 %). Zimmermann injiziert Pflanzenteile unter der Luftpumpe mit Zuckerlösung, um gleichzeitig die Luft aus den Interzellularen zu entfernen. Meist genügt direktes Eintragen in die auf dem Objektträger befindliche Lösung. Ein Eintragen in Wasser ist im allgemeinen zu vermeiden. Die Chlorophyllkörner sind sehr empfindliche Gebilde, die meist schon in

---

[1]) M. Mascré, Sur la fixation du chondriome de la cellule végétale, Compt. rend. Acad. sciences, Paris 1927, CLXXXV, S. 866.

[2]) A. Guilliermond, Sur la coloration vitale des chondriosomes, Compt. rend. soc. biol., 1923, LXXXIX, II, S. 527.

[3]) Ph. Joyet-Lavergne, Contribution é l'etude du chondriome d'un champignon du genre Saprolegnia, Compt. rend. Acad. sciences, Paris, 1928, CLXXXVI, S. 595. Derselbe, La pouvoir oxydo-reducteur du chondriome des Grégarines et les procédés de recherches du chondriome, Compt. rend. soc. Biol., 1928, XCVIII, S. 501. Derselbe, Sur les rapports entre le nucléole, la chondriome et le glutathion, ebenda S. 567; s. a. Protoplasma, 1929, VI, S. 84.

Wasser quellen und sich mehr oder weniger vollständig zersetzen. Die Körner von Hedera helix, Malpighia coccigera, Taxus bacc. u. a. sind gegen Wasser widerstandsfähig. Die Widerstandsfähigkeit hängt nicht mit den Altersstadien der Körner zusammen, teils sind die Körner jüngerer Blätter resistenter (Dammara robusta, Hedera helix), teils die älterer Blätter (Araucaria, Taxus bacc., Abies pect.)[1].

Die Chloroplasten der allermeisten Pflanzen werden selbst bei Beachtung aller erforderlichen Vorsichtsmaßregeln nur als homogen gefärbte Gebilde erscheinen, in denen Einschlüsse (meist Stärke, dann Öltropfen, Proteinkristalloide u. a.) zugegen sind. Bei den Chromatophoren von Anthoceros stellte Scherrer amöboide Formenänderungen fest und schloß daraus auf den flüssigen Aggregatzustand. Ob die einzelnen Körner mit einer (farblosen) Membran umgeben sind, ist strittig. A. Meyer, Schmitz u. a. verneinen das Vorhandensein einer Membran, ersterer[2]) nimmt Umhüllung durch „metaboles" Cytoplasma an; Fr. Schwarz, Bredow, Kny treten für eine Membran ein, ebenso Czapek (aus theoretischen Gründen). Küster[3]) hält sie für ein Kunstprodukt (Fig. 157). Für eine Membran spricht der Befund, daß die einzelnen Körner in der lebenden Zelle selbst bei dichter Lagerung nicht miteinander verschmelzen[4]). Senn[5]) tritt für eine Hülle (Peri-

Fig. 157. Chlorophyllkörner jugendlicher Organe, *a*) Adiantum capillus veneris (Zuckerlös.), *b*) Strychnos nux vom. (Osmiumdampf, verd. Alkohol), *c*) Strychnos (Jodjodkalium, verd. Alkohol) (Tunmann); *d*) Podocarpus lacta (mit Randzone, Degenerationserscheinung, nach Vouk)

[1]) H. Bredow, Beitr. z. Kenntn. d. Chromatoph., Jahrb. f. wiss. Bot., 1891, XXII, S. 347. — V. Vouk, Laubfarbe u. Chromoplastenbild. b. immergr. Holzgew., Sitzgsber. Wien. Ak., 1908, CXVII$_1$, S. 1337.

[2]) A. Meyer, Die Hülle der Chromatophoren, Ber. deutsch. bot. Ges., 1922, XL, S. 161.

[3]) E. Küster, Über amöboide Formveränderungen der Chromatophoren höherer Pflanzen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1911, XXIX, S. 362.

[4]) Bei niedriger Temperatur beobachtete G. Haberlandt eine Fusion der Chlorophyllkörner (Über den Einfluß des Frostes auf die Chlorophyllkörner, Österr. bot. Zeitschr., 1876, XXVI, S. 249).

[5]) G. Senn, Die Gestalts- u. Lageveränderung d. Pflanzenchromatophoren, Leipzig 1908.

stromium) ein. Fortsätze des Peristromiums, „Pseudopodien", befähigen die Chloroplasten zu aktiven Bewegungen. Ohne Reagentien sind diese Verhältnisse an Funaria hygrometrica sichtbar. Die Pseudopodien der einzelnen Körner stehen untereinander in Verbindung und bilden eine Netzstruktur (Fig. 157b u. c), die freilich von anderer Seite als zum Grundplasma gehörig betrachtet wird. An Leukoplasten wurden Pseudopodien bei verschiedenen Orchideen (Listera ovata, Blattunterseite, Orchis latif., Epidermiszellen, O. incarn.) studiert. Sie gehören der Chromatophorenmasse selbst an, veranlassen amöboide Formveränderungen, tragen aber zur Ortsveränderung wenig bei. Die Formveränderung wird besonders bei Zusatz wasserentziehender Lösungen deutlich. Epidermispräparate werden in n-Rohrzucker, n-Kalium- oder Kalziumnitrat gelegt, die Lösungen bei Eintritt der Wirkung mit Wasser wieder ausgewaschen (Küster).

Wie zuerst Rosanoff bei Bryopsis fand, und Schimper bei Anthoceros sowie Haberlandt[1]) bei Selaginella beobachteten, zeigen die Chloroplasten dieser Pflanzen bei Wasserzutritt eine krummradiale Streifung; doch ist diese Erscheinung noch nicht näher aufgeklärt.

Von den Chloroplasten sagt Zacharias[2]), sie „werden bis auf beträchtlichere Reste vom Magensaft gelöst. Die Verdauungsreste quellen nicht in 10proz. Kochsalzlösung".

Beim Studium erwachsener Chromatophoren stehen Fixierung und Färbung an zweiter Stelle und werden weniger zu Strukturstudien als zur Sichtbarmachung äußerst kleiner Leukoplasten und zum Auffinden von Chloroplasten in panachierten Blättern benutzt. Derartige Fälle sind relativ selten, denn überwiegend sind sie ohne weiteres als scharf abgegrenzte Gebilde selbst in chlorotischen Geweben bei scharfer Beobachtung gut zu erkennen. Bei dem überaus weichen Stroma muß auch hier ganz besonders auf die Fixierungsmittel geachtet werden und Vergleiche mit lebendem Material sind unerläßlich; zum Beispiel wurde die von Senn betonte „Sterngestalt" fixierter Chloroplasten von Knoll[3]) als ein Kunstprodukt angesprochen, entstanden durch schlechte Fixierung mit heißem Weingeist.

Zum Fixieren benutzt man gesättigte Lösungen von Sublimat oder Pikrinsäure in absolutem Alkohol (Einwirkung 24 Stunden, Auswaschen in fließendem Wasser), zuweilen siedendes Wasser (Zimmermann, Mikrot., S. 197), auch Jodjodkalium. Senn fixiert Blatt-

[1]) G. Haberlandt, Flora 1888, u. Physiol. Pflanzenanat., 1904, III. Aufl., S. 238.

[2]) Die chem. Beschaffenheit von Protoplasma u. Zellkern, Progr. rei. bot., 1909, III, S. 222.

[3]) Fr. Knoll, Netzartige Protoplasmadiff. u. Chloroplastenbew., Sitzgsber. Wien. Ak., 1908, $CXVII_1$, 1227.

stücke mit siedendem Weingeist oder Sublimatweingeist. Gute Erfolge liefert Osmiumsäure mit Weingeistbehandlung nach Lidforss[1]). Feine Freihandschnitte (Haemanthus cocc., Epidermis) werden mit der Pinzette 5—15 Sekunden dicht über 2proz. Osmiumsäure gehalten und sofort in 10proz. Weingeist, dann nacheinander in Weingeist übertragen, der um 5 % stärker ist, bis sie in absoluten Alkohol gelangen. In jeder Flüssigkeit bleiben sie 2—5 Minuten. Nach 12 Stunden erfolgt die Übertragung der Schnitte in immer schwächeren Weingeist, schließlich in Wasser, dann folgt Färbung nach Zimmermann, Einschließen in Glyzeringelatine oder Kanadabalsam. Die kinoplasmatischen Verbindungsfäden zwischen Kern und Chromatophoren sind nun deutlich gefärbt. Kontraktionen des Stromas sind bei keinem Verfahren völlig ausgeschlossen.

Zur Färbung benutzt man eine 0,2proz. wässerige Lösung von Säurefuchsin (5—20 Minuten, dann sofort mit fließendem Wasser abwaschen) oder eine konzentrierte wässerige Lösung von Jodgrün (1—2 Minuten, abspülen mit Wasser, Glyzerin). Bei Dauerpräparaten erfolgt nach der Färbung und dem Abwaschen erst Austrocknen, dann Xylol, Kanadabalsam (Zimmermann, Zeitschr. wiss. Mikr., 1890, VII, 6). Senn setzt dem Säurefuchsin etwas Jodalkohol zu, überfärbt stark und differenziert mit einer gesättigten Lösung von Jod in Alkohol (30 %), so daß nur Chromatophor und Zellkern gefärbt bleiben.

H. Fischer (Lit. S. 306, 5) benutzt Farben, welche die Stärkesubstanz farblos lassen (Anilinblau, Kongorot, Cyanin, Nigrosin u. a.), Schimper Gentianaviolett und Hämatoxylin, J. H. Salter (Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXII, 116) Methylviolett, S. Prowazek 2proz. Gentianaviolett (Fixierung 1proz. Chromessigsäure, Österr. bot. Ztg., 1900, L, 69), E. Pantanelli (Malphighia 1902, XV, 363) wäscht mit Salzsäure-Wasser aus. E. Heinricher (Cohns Beitr., 1895, VII) fixiert die sich leicht zersetzenden Leukoplasten der Schuppenwurz mit siedendem Wasser und färbt mit Methylenblau.

Werden die Plastiden durch Stärke zu sehr verdeckt, so muß man (nach Fixierung) die Stärke zum Quellen bringen; bei Euglenen wird Paramylon durch 10proz. Kalilauge zur Quellung gebracht. H. Zumstein (Morph. und Phys. d. Eugl. grac., Jahrb. f. wiss. Bot., 1909, XXXIV, 149).

Die Farbstoffe der Chromatophoren

Wenn wir einen Querschnitt durch ein frisches Blatt mit Weingeist oder Äther ausziehen, dann entfärben sich die Chlorophyllkörner.

[1]) B. Lidforss, Über kinoplasmat. Verbindungsfäden zwischen Kern und Chromatophoren, Lunds Univ. Arsskrift, 1908, N. F. Afd., 2, IV.

während grüne Streifen abfließen. Die grüne Flüssigkeit[1]) enthält die Farbstoffe der Chloroplasten, die Chlorophylle, Karotin und die Xanthophylle.

Schüttelt man den weingeistigen Auszug mit Benzol, so erhält man zwei Schichten. Die benzolische enthält das Chlorophyll, in der weingeistigen bleiben die nichtgrünen Begleiter[2]) Aus 1 kg getrockneten = 4 kg frischen Holunderblättern erhielt Willstätter 6,2 g Chlorophyll a, 2,3 g Chlorophyll b, 0,6 g Karotin, 0,9 g Xanthophylle.

Die gelben Pigmente der Chloroplasten dienen nach Iwanowski[3]) dazu, das Chlorophyll zu schützen, da sie wahrscheinlich die blauen und besonders die violetten Strahlen absorbieren.

Die Farbstoffe, die in herbstlichen Blättern nach dem Verschwinden des Chlorophylls auftreten, gehören in die Gruppe des Lycopins und Rhodoxanthins. Letztere unterscheiden sich von den ersteren durch ihre leichte Löslichkeit in konz. Ameisensäure (Lubimenko[4])).

Zur Untersuchung der Blattfarbstoffe extrahiert Lippmaa[5]) mit Azeton, führt die Farbstoffe in Äther über und verseift das Chlorophyll. Die ätherische Lösung wird etwas eingedampft, dann mit Weingeist verdünnt. Danach füllt man die Lösung in 6 cm breite und 20 cm hohe Glaszylinder, in denen sich 5 cm breite, 20 cm lange Filtrierpapierstreifen (je 2 Streifen) befinden. Die Farbstoffe lagern sich in Bändern ab, die näher untersucht werden.

Rhodoxanthin und Xantophyll scheiden sich in gleicher Höhe ab, so daß geringe Mengen von Rhodoxanthin von Xanthophyll überdeckt werden.

Rhodoxanthin wird durch 20proz. Salzsäure schnell ausgebleicht. Bringt man die Filtrierpapierstreifen nach 1—2 Minuten in van Wisselinghs Reagens (Lösung von Antimonchlorür in 25proz. Salzsäure), so wird Phylloxanthin blau, Xanthophyll dunkelindigoblau, Karotin violett, das Rhodoxanthinband verschwindet.

Mit Ameisensäure geht das Rhodoxanthin zunächst mit unverändert roter Farbe in Lösung; nachher wird die Flüssigkeit gelb oder farblos. Auch durch Lauge wird Rhodoxanthin allmählich zersetzt.

[1]) Weingeist löst aus den Chlorophyllkörnern von Elodea außer dem Chlorophyllfarbstoff ein phosphorreiches Lipoid. (W. Biedermann, Mikrochemische Beobachtungen an den Blattzellen von Elodea, Flora 1918, N. F., 11—12, CXI bis CXII, S. 560.)

[2]) Für die veresterten Carotinoide verschiebt sich die Löslichkeit; sie wandern in die Oberschicht (Zechmeister und v. Cholnoky, Zeitschr. physiol. Chem., 189, 159 (1930).

[3]) D. Iwanowski, Über die Rolle der gelben Pigmente in den Chloroplasten, Ber. deutsch. bot. Ges., 1913, XXXI, S. 613.

[4]) O. Lubimenko, Recherches sur les pigments des chromoleucites, Compt. rend. Acad. sciences, Paris 1914, CLVIII, S. 510.

[5]) Th. Lippmaa, Über den vermuteten Rhodoxanthingehalt der Chloroplasten, Ber. deutsch. bot. Ges., 1926, XLIV, S. 643.

Die Chlorophyllfarbstoffe

Willstätter hat den grünen Blattfarbstoff in ein Chlorophyll a und b zerlegt.

Chlorophyll a. Blauschwarzes mikrokristallinisches Pulver, aus Äther-Petrolätherlösungen, Drusen aus lanzettförmigen Blättchen. F. (nach vorhergehendem Sintern) 117—120°. Leicht löslich in Weingeist u. dgl., schwer in Methanol, sehr schwer in Petroläther. Die weingeistige Lösung ist tief blaugrün mit roter Fluoreszenz, die ätherische blau.

Chlorophyll b. Kristallinisches dunkelgrünes bis grünschwarzes Pulver. Wird, nachdem es bei 86—92° zusammengesintert bei 120—130° zähflüssig. Ist schwerer löslich als a, in Petroläther nahezu unlöslich. Die Farbe der Lösungen ist grün, in Schwefelkohlenstoff gelbgrün. Fluoreszenz mehr braunstichig rot.

Beide Bestandteile enthalten Magnesium, das sie durch Behandlung mit Säuren unter Übergang in die Phäophytine verlieren.

Durch Alkalien lassen sich die Chlorophylle unter Verbleib des Magnesiums verseifen. Phäophytin a liefert mit Alkalien Phytochlorine, Phäophytin b das Phytorhodin g, beide neben Phytol und Methanol. Phytochlorin und Phytorhodin lassen sich zu dem Pyrrolderivat Ätioporphyrin abbauen, das man auch aus Blutfarbstoff erhalten kann.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmethode kam Wilschke[1]) zu der Ansicht, daß das Chlorophyll der Phäophyceen, Diatomeen und das von Hydrurus vom Chlorophyll der grünen Pflanzen wesentlich verschieden ist.

Phytol ist eine farblose, ölige Flüssigkeit, die bei 0,03—0,04 mm Druck bei 145° siedet.

Löslich in Weingeist, Eisessig, Chlorallösung. Färbt sich mit Fettfarbstoffen (Alkannin, Cyanin, Sudanrot) und Jod. Mit Dämpfen von Osmiumsäure zunächst braun, dann schwarz. Mit Phlorogluzin-Salzsäure (weingeistige Lösung des Phlorogluzins + Salzsäure intensiv braun. Die Reaktion ist empfindlich. Es gelang aber Raciborski[2]) damit nicht, freies Phytol in lebenden Pflanzenzellen zu finden.

In den gelblichen Blättern im Dunkeln kultivierter Pflanzen findet sich ein grüner rot fluoreszierender Farbstoff, den Noack[3]) aus Kürbissamenhäuten darstellen konnte. Das Mg-freie Derivat dieses „Protochlorophylls" ist wahrscheinlich identisch mit dem Gallenfarbstoff Bilipurpurin und kann aus den Mg-freien Derivaten des Chlorophylls durch Reduktion hergestellt werden. Die letzte Stufe der Chlorophyllbildung in der Pflanze ist danach wahrscheinlich eine durch kleine Eisenmenge katalysierte Photooxydation.

---

[1]) A. Wilschke, Über die Fluoreszenz der Chlorophyllkomponenten, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1914, XXXI, S. 338.

[2]) M. Raciborski, Die Mikrochemie des Phytols, Kosmos, 1913, XXXVIII, S. 1657; Ref. in Bot. Zentralbl., 1914, CXXVI, S. 608.

[3]) K. Noack, Zur Entstehung des Chlorophylls und dessen Beziehung zum Blutfarbstoff, Naturwissenschaften, 1929, XVII, S. 194.

Wie das Chlorophyll, so wird auch das Protochlorophyll von Xanthophyll und Karotin begleitet[1]).

(K. Noack und W. Kießling, Zur Entstehung des Chlorophylls und seine Beziehung zum Blutfarbstoff, Zeitschr. physiol. Chem., 1929, CLXXXII, S. 13; dort auch Angaben früherer Autoren über Protochlorophyll).

Fig. 158. Hypo kristalle (Adiantum capillus veneris, Epidermis), mit Eisessig erhalten (Tunmann)

Zum mikrochemischen Nachweis des Chlorophyllgrüns dienen nachstehende Methoden: Die Hypochlorin- oder Chlorophyllanreaktion[2]) kann man mit Salzsäure (1 + 4 Wasser) oder mit Eisessig ausführen. Zu Präparaten lebenden Materials wird unter Deckglas Eisessig gebracht. Innerhalb weniger Minuten treten aus den Chlorophyllkörnern große Tropfen aus, die eine gelbgrüne Flüssigkeit bilden, aus welcher größere und kleinere braune Hypochlorinkristalle anschießen (Fig. 158). Gleichzeitig entfärbt sich die Flüssigkeit. Die Reagentien dürfen nicht im Überschuß zugesetzt werden. Durch Erhitzen bis nahe zum Sieden lassen sich die aus Eisessig erhaltenen Kristalle umkristallisieren und es entstehen dann meist Drusen gerader Nadeln (Fig. 159). Die Kristalle lösen sich in Rizinusöl (beim Erhitzen), Chloroform, Äther, Petroläther (langsam), wässerigem Chloralhydrat (bis auf ein in Weingeist lösliches Tröpfchen), Weingeist (langsam), Eisessig (in der Kälte kaum, heiß leicht). Osmiumsäure härtet sie innerhalb 24 Stunden derart, daß sie in Chloral, Äther, Weingeist unlöslich werden. Kalilauge löst sie nicht (A. Meyer, Lit. S. 44, 1). Schöne Hypochlorinkristalle erhält man, wenn man die mit Petroläther befeuchteten Präparate unter Deckglas einige Tage in einem mit Petrolätherdämpfen gesättigten Raume liegen läßt.

Fig. 159. kristall Essigsä p schnitt (Tunmaun)

Die Reaktion läßt sich auch mit Wasserstoffsuperoxyd, Ferrocyankalium (M. Tswett, Arch. sc. phys. nat., 1896, CI, 336) und mit einer gesättigten Kalilauge ausführen (Lit. S. 268, 3). Die Kalilauge führt die grüne Farbe des Chlorophylls sofort in Braun über. Nach 2—30 Minuten (beim Erhitzen sofort) geht die braune Färbung in

[1]) T. N. Godnew u. S. R. Korsghenewsky, Über die gelben Begleitstoffe des Protochlorophylls, Planta, 1930, X, S. 811.

[2]) N. Pringsheim, Lichtwirk. u. Chlorophyllfunkt., Jahrb. f. wiss. Bot., 1879, XII, 288.

Grün zurück. Das gleiche Resultat bewirkt Zusatz von Wasser, weniger schnell wirken Äther, Weingeist, Glyzerin. Die Präparate dürfen zuvor nicht mit Wasser benetzt werden. Bei Cyanophyceen und Florideen erfolgt diese Hypochlorinreaktion nur undeutlich, bei Diatomeen und Phäophyceen erst nach Vorbehandlung mit siedendem Wasser.

Bei der Chloroglobin-Reaktion[1]) dient eine konzentrierte Lösung von Resorcin (10 + 10); diese löst das Cytoplasma, während die Chloroplasten unter Ausscheidung grüner Tröpfchen zu halbflüssigen Massen zusammenfließen. Benutzt man eine durch Ammoniak alkalisch gemachte Resorcinlösung, dann werden auch die Chloroplasten gelöst und der Farbstoff aller Chloroplasten einer Zelle fließt in großen Tropfen zusammen (Chloroglobin). Wird Chloroglobin mit Wasser oder Glyzerin ausgewaschen, so ballt es sich zu Klumpen zusammen, die durch Eau de Javelle entfärbt werden und dann Methylenblau, Cyanin, Jodgrün, Fuchsin und Chrysoidin speichern, aber keine Eiweißreaktionen geben.

Nachweis als Äthylchlorophyllid (kristallisiertes Chlorophyll)

a) Zur Herstellung von „kristallisiertem Chlorophyll" (Borodin 1882; Monteverde 1893) zieht man geeignete Blätter (Galeopsis tetrahit, Asparagus officinalis, Mentha aquatica) 6—24 Stunden mit wenig Weingeist aus und läßt einige Tropfen des Auszugs auf dem Objektträger langsam eindunsten. Nach 4—12 Stunden entstehen neben den rötlichen Kristallen der Carotinoide die grünen mikrokristallinischen Dreiecke oder Sechsecke des Äthylchlorophyllids (Kolkwitz)[2]).

b) siehe S. 693.

Über die Form, in der sich das Chlorophyll im Chloroplasten befindet, gehen die Ansichten weit auseinander, wie aus dem Folgenden hervorgeht:

Das Chlorophyll ist in der intakten Zelle in lipoider, echter und fluoreszierender Lösung enthalten (Stern)[3]).

Im lebenden Blatt ist das Chlorophyll an das Chloroplasteneiweiß in monomolekularer Schicht adsorbiert (Noack)[4]).

Sehr kleine Mengen von Chlorophyll kann man mit der Analysenquarzlampe durch seine feuerrote Fluoreszenz in wasserhaltigem Äther

[1]) M. Tswett, Das Chloroglobin, Bot. Zentralbl., 1900, LXXXI, S. 81.

[2]) R. Kolkwitz, Ber. deutsch. bot. Ges., 1920, XXXVIII, S. 245.

[3]) K. Stern, Untersuchungen über Fluoreszenz und Zustand des Chlorophylls, Ber. deutsch. bot. Ges., 1920, XXXVIII, S. 28.

[4]) K. Noack, Der Zustand des Chlorophylls in der lebenden Pflanze, Biochem. Zeitschr., 1927, CLXXXIII, S. 135.

nachweisen (Danckwortt und Pfau)[1]. Trockenes Material kann direkt unter der Lampe mit wasserhaltigem Äther übergossen werden; von frischem Material bereitet man sich eine weingeistige Lösung, setzt Wasser hinzu und schüttelt mit Äther aus.

Die Carotinoide

Die Carotinoide sind eine Gruppe von gelben und orangefarbenen im Pflanzenreich weitverbreiteten Stoffen, deren Name vom Carotin, dem von Wackenroder 1831 entdeckten Farbstoff der Wurzel von Daucus Carota sich ableitet, während der an zweiter Stelle isolierte Stoff dieser Gruppe, das Xanthophyll, 1837 von Berzelius in herbstlich gelben Blättern entdeckt wurde.

Carotinoide sind regelmäßige Begleiter des Chlorophylls, kommen aber auch unabhängig von diesem vor, so in einer Anzahl von Pilzen. Es gehören in diese Gruppe teils O-freie Stoffe wie Carotin und Lycopin, teils O-haltige wie Xanthophyll und Fucoxanthin.

Als carotinoide Farbstoffe bezeichnet Kylin[2]) folgende in den höheren Pflanzen vorkommende: Lycopin, Capsumin α, β, γ, Arumin, Rhodoxanthin und Taxorhodin, Physalin, Sorbusin, Carotin, Xanthophyll, Phylloxanthin, Calendulin, Phyllorhodin.

In Algen kommen vor: Carotin, Calorhodin, Phyllorhodin, Xanthophyll, Myxorhodin α und β, Phylloxanthin, Fucoxanthin α und β, Peridimin.

Vgl. dazu F. E. Meier, Recherches expérimentales sur la formation de la carotine chez les Algues vertes unicellulaires usw., Bull. soc. bot. Genève, 1929 [2], XXI, S. 160.

Physalien, der kristallinische Farbstoff der Physalis-Kelche und -Früchte ist ein Wachs, das sich durch alkoholische Verseifung in zwei Moleküle Palmitinsäure und einen mit Xanthophyll isomeren Polyenfarbstoff, das Zeaxanthin, zerlegen läßt[3]). Derartige „Polyen-Wachse" scheinen weit verbreitet.[4])

[1]) P. W. Danckwortt u. E. Pfau, Der Nachweis des Chlorophylls mit Hilfe der Analysen-Quarzlampe, Arch. d. Pharmazie, 1927, CCLXV, S. 560; P. W. Danckwortt, Über den Nachweis von Chlorophyll mit Hilfe der Lumineszenzanalyse, Apoth.-Ztg. 1930, XLV, Nr. 14.

[2]) H. Kylin, Über die carotinoiden Farbstoffe der höheren Pflanzen, Zeitschr. physiol. Chem., 1927, CLXIII, S. 229; Über die carotinoiden Farbstoffe der Algen, ebenda, 1927, CLXVI, S. 38.

[3]) R. Kuhn, A. Winterstein, W. Kaufmann, Über ein kristallisiertes Farbwachs, Die Naturwissensch., 1930, XVIII, S. 418; Ber. d. chem. Ges., 1930, LXIII, S. 1489.

[4]) L. Zechmeister u. L. v. Cholnoky, Über den Zustand der sauerstoffhaltigen Carotinoide in der Pflanze, Zeitschr. physiol. Chem., 1930, CLXXXIX, S. 159.

Zeaxanthin kommt im Arillus von Evonymus europaea, wahrscheinlich als Ester vor, L. Zechmeister u. K. Szilárd, Zeitschr. physiol. Chem. 190, 67 (1930).

Zuweilen findet man in Chlorophyllkörnern neben Chlorophyll rötliche Carotintröpfchen (fertile Sprosse von Equisetum arvens. u. limos., Selaginellen und in Tropenplanzen, W. Rothert, Lit. S. 767). Durch starke Belichtung kann bei Aloe Carotinbildung erzeugt werden. Bei Verdunkelung der rotbraunen Blätter erfolgt Rückbildung in Chlorophyll. Die Rotfärbung der Aloeblüten führt Schimper[1]) auf Carotine, Crouchet auf noch unbekannte Farbstoffe zurück. Ob in den Wurzeln von Dracaena, Sanseviera und anderen Liliaceen Carotin auftritt, wie Schmied[2]) aus dem Vorkommen rubinroter Tröpfchen folgert, muß noch ermittelt werden. Bei der Kalimethode entstehen körnige Ausscheidungen, mit Salzsäure-Phenol tritt keine Blaufärbung ein.

Die Sekretzellen von Rehmannia, die den Blättern mattrote Punkte verleihen, und die Sekretzellhaare des Kelches sind dicht mit roten Kugeln erfüllt, welche bei Wasserzutritt zu einer rotbraunen Masse zusammenfließen. Diese wird mit Jodjodkalium schwarzbraun, bei nachfolgendem Kalizusatz aber wieder rot. In Alkohol wird ein Teil des Farbstoffes zu einer gelben Flüssigkeit gelöst. Schwefelsäure färbt violett, wahrscheinlich liegt ein Xanthocarotin vor (H. Solereder, Gatt. Rehmannia, Ber. bot. Ges., 1909, XXVII, S. 390).

Viele der in Algen und Pilzen auftretenden gelbroten Farbstoffe, die früher als Lipochrome bezeichnet wurden, sind als Carotine erkannt.

Den Chromoplasten nahe steht der **Augenfleck** (Stigma), der bei beweglichen Algen und Schwärmsporen gewöhnlich am vorderen Ende in der Einzahl auftritt und aus einem plasmatischen Stroma besteht, in dem ein ölartiger bräunlicher bis roter Körper eingelagert ist. Der Farbstoff zählt zu den Carotinen (Hämatochrom, G. Klebs, Flagellatenstud. II, Zeitschr. wiss. Zool., 1892, LV, S. 401), wenigstens wird der rote Augenfleck grüner Algen mit Schwefelsäure blau. Mit dem Augenfleck nicht zu verwechseln sind die bisweilen, aber nicht immer in den Kolonien (Syncrypta Volvox) auftretenden karminroten Pigmenttröpfchen, die in keiner Beziehung zum Chromatophor stehen und sich in der Nähe der Zelloberfläche und der Geißelbasis im farblosen Zellende befinden (A. Scherffel, Augenpunkt. v. Synura und Syncrypta, Ber. bot. Ges., 1904, XXII, S. 443).

Hämatochrom (Cohn 1867; Zopf 1895; Kylin 1927), der rote Farbstoff von Hämatococcus, auch rotes Carotin genannt, ist auch bei anderen Algen nachgewiesen (Volvocineen, Protococcaceen, Palmaleen, Chroolepus) und kommt anscheinend in mehreren Modi-

[1]) A. F. W. Schimper, Unters. üb. d. Chlorophyllkörn. u. die ihnen homol. Gebilde, Jahrb. f. wiss. Bot., 1885, XVI, 108. — H. Molisch, Vorüberg. Rotfärb. d. Chlorophyllk. in Laubblätt., Ber. d. bot. Ges., 1902, XX, 442. — L. Crouchet, Rech. s. l. chromoleucites, Ann. scienc. nat., 1888, VII, 350.

[2]) H. Schmied, Carotin in den Wurzeln von Dracaena und Liliaceen, Österr. bot. Ztg., 1903, LIII, 313.

fikationen vor. Gibt mit Natronlauge allmählich eine Natriumverbindung, die in Wasser unlöslich, in Weingeist schwer löslich, in Äther sehr schwer löslich und in Petroläther unlöslich ist.

Carotin. Rhombenförmige fast quadratische Blättchen (aus Petroläther), vierseitige, häufig eingekerbte Blättchen (aus Äther), F. 167,5—168° (korr.). Auch in siedendem Weingeist nur schwer löslich, wenig löslich auch in Petroläther, Äther, Azeton, leichter in Benzol, leicht in Schwefelkohlenstoff und Chloroform. Die Lösung in Schwefelkohlenstoff ist rot, die sehr verdünnten Lösungen in anderen Lösungsmitteln intensiv gelb, konzentriertere tieforange. Gibt mit Antimontrichlorid eine blaue Färbung. Löst sich in konzentrierter Schwefelsäure zu blauer Lösung, die beim Verdünnen mit Wasser grüne Flocken ausfallen läßt.

Beim Vergilben wandelt sich das Carotin des grünen Blattes in einen andern gelben Farbstoff um (Tswett, Molisch)[1].

Xanthophyll. Vierseitige oft trapezförmige Täfelchen und schwalbenschwanzförmige Zwillinge (aus Methanol), lanzett- und keilförmig zugespitzte Prismen (aus Weingeist). In der Durchsicht gelb bis orange, in der Aufsicht meist dunkelbraunrot mit stahlblauem Reflex. F. (nach vorhergehendem Zusammensintern) 172°. Unlöslich in Petroläther, schwer in Methanol, besser in Äthylalkohol, Äther und Azeton löslich; sehr leicht löslich in Chloroform und Phenol. Gegen konzentrierte Schwefelsäure wie Carotin. Die zunächst grüne Lösung in starker weingeistiger Salzsäure wird nach einigen Minuten blau. Xanthophyll ist ein zweiwertiger Alkohol.

Wahrscheinlich gibt es mehrere Xanthophylle, da nach Zechmeister und Tuzson das Xanthophyll des grünen Blattes aus einander sehr ähnlichen aber ungleich drehenden Komponenten besteht. Das Vorkommen zweier Xanthophyll-Modifikationen (Xanthophyll und Phylloxanthin) war schon vorher von Kylin behauptet worden[2].

Nach Zechmeister u. Tuzson (Ber. deutsch. chem. Ges., 1930, LXIII, S. 3203) kommt im Blatt als Begleiter des Chlorophylls und Carotins stets mehr als eine Xanthophyll-Art vor, während die xanthophyllhaltigen Blütenpigmente entweder ein mit dem Blätter-Xanthophyll vergleichbares Gemisch enthalten (z. B. Löwenzahn), oder aber ein individuelles Xanthophyll (z. B. Lutein in der Sonnenblume und in anderen Blüten). Die bisher nur vereinzelt untersuchten xanthophyll- oder zeaxanthin-führenden Fruchthäute und Samenhüllen gehören der letzteren Untergruppe an.

Nach v. Wisselingh[3]) lösen sich Carotinoide in Seifenspiritus und 70proz. Chloralhydratlösung, ein Teil von ihnen auch in einem Gemisch von 3 Teilen kristallisiertem Phenol und 1 Teil Glyzerin.

[1]) H. Molisch, Über die Vergilbung der Blätter, Sitzgsber. Wien. Akad. Math.-naturw. Kl., Abt. I, 1918, CXXVII, S. 3.

[2]) Tswett hatte schon 1910 vier Xanthophylle angenommen (Die Chromophylle in der Pflanzen- und Tierwelt (Russisch)).

[3]) C. van Wisselingh, Über die Nachweisung und das Vorkommen von Carotinoiden in der Pflanze, Flora, 1915, N. F. VII, S. 371.

Die Xanthocarotine treten in den Chromoplasten teils in einer flüssigen fettartigen Substanz gelöst, teils in kristallinischer Form auf. Bemerkenswert ist das Vorkommen eines Carotins in der Nebenkrone von Narcissus poeticus, wo die den roten Saum zusammensetzenden Zellen von orangeroten dessen Färbung hervorrufenden Kristallen erfüllt sind (H. Molisch)[1]) und in den Hydathoden von Ficus javanica[2]). Selten kommen Grana (amorph) neben Kristallen in den gleichen Chromoplasten vor (Lycopersicum, Sol. dulcamara). Die Farbstoffkristalle zeichnen sich durch starken Pleochroismus aus, sind tafel-, stäbchen-, spindel-, sichel-, nadelförmig und beeinflussen mehr oder weniger die Gestalt der Chromoplasten. Sie sind teils zu mehreren, teils einzeln dem Stroma eingelagert. Letztere können so stark heranwachsen, daß sie das Stroma bis auf geringe Reste verdrängen. Doch führen sie immer eine protoplasmatische Grundlage und sind von einem plasmatischen Häutchen umschlossen (Fig. 160). Bei der Auswanderung der nutzbaren Stoffe aus den Blättern im Herbst, beim Vergilben des Laubes, zersetzen sich die Chlorophyllkörner. Das Chlorophyllgrün wandert in den Stamm zurück. Die Xanthocarotine verbleiben im Blatte, überwiegend in Gestalt kleiner Tröpfchen; zuweilen kommt es aber zur Kristallbildung (Fig. 160f), sehr oft in Conium (O. Tunmann, Pharm. Ztg., 1905, L, S. 1055). Die in der Zelle auftretenden Kristalle sind direkt mit Reagentien nachweisbar.

Fig. 160. Chromatophoren aus: a) Daucus carota, b) Sorbus aucuparia, c) Crataegus coccinea, d) Capsicum annuum, e) Citrus vulgaris; f) Xanthocarotinkristalle, aus Chloroplasten vergilbender Herbstblätter von Conium maculatum entstehend (Tunmann)

Gertz[3]) erhielt Kristalle von Carotin, wenn er die Blätter gewisser Heracleum-Arten (H. granatense Boiss., H. eminens Lange, H. villosum Fisch. und H. pyrenaicum Lam.) mit Azeton in einer Schale zerrieb; es ist auch mit Molischs Kalimethode nachzuweisen. Aus Strobilanthes Dürianus erhält man Carotinkristalle mit Weingeist.

[1]) H. Molisch, Kristallisiertes Carotin in der Nebenkrone von Narcissus poeticus, Ber. deutsch. bot. Ges., 1918, XXXVI, S. 281.

[2]) H. Molisch, Über orangefarbige Hydathoden bei Ficus javanica, Ber. deutsch. bot. Ges., 1916, XXXIV, S. 66.

[3]) O. Gertz, Om kristalliserande bladpigmenter hos Heracleum-arter och hos Strobilanthes Dürianus, Bot. Notis., 1918, S. 49; Ref. Bot. Zentralbl., 1918, CXXXVIII, S. 403.

In den Chloroplasten sind die Xanthocarotine im Chlorophyllfarbstoff durch das Chlorophyllgrün verdeckt und müssen zunächst durch eine der nachstehenden Methoden zur Abscheidung gebracht werden.

Da die Xanthophylle in den Pflanzen als Ester vorkommen können, so erhält man je nach den Bedingungen den ursprünglichen oder den verseiften Farbstoff oder Gemische von beiden (Zechmeister und v. Cholnoky, l. c. S. 781, 4).

1. Die Kalimethode: Man legt frische grüne Blätter (besser Blattstücke) in weingeistige Kalilauge (20,0 Kaliumhydroxyd, 80,0 Weingeist, 40 Vol.-%) und beläßt sie in vor Licht geschützten und gut verschlossenen Gefäßen (um die Kohlensäure der Luft auszuschalten) mehrere Tage, bis alles Chlorophyll ausgezogen ist. Xanthocarotin ist im Gewebe verblieben. Die Pflanzenstücke werden nun mit destilliertem Wasser gut ausgewaschen (etwa 12 Stunden) und gelangen auf 1—2 Tage in Glyzerin. Die Präparate zeigen in den meisten Fällen in den ursprünglich chlorophyllhaltigen Zellen das Carotin in Kristallform. Es sind orangegelbe bis braunrote, perlmutterglänzende Kristalle (einzelne Nadeln, stern- und büschelförmige Gruppen, Tafeln, Schuppen (Fig. 161), die dem rhombischen und monoklinen, vielleicht auch dem triklinen System angehören (Becke). Die verschiedenen Kristallformen weisen bereits darauf hin, daß neben Carotin auch Xanthophylle zur Kristallisation gelangt sind. In einzelnen Fällen hat Molisch[1]) nur gelbe Tröpfchen erhalten. Diese Ausnahmen erklärt Rywosch (Lit. S. 263, 6) mit der größeren und kleineren Menge des im Blatte vorhandenen Öles. Ist wenig Öl vorhanden, dann kristallisieren die Farbstoffe aus. Bei Gegenwart größerer Mengen Öles werden die Farstoffe vom Öle aufgenommen. Nach Rywosch steigt der Gehalt des „Öles" mit dem Alter des Blattes und so erhielt er bei jungen Blättern Kristalle, bei alten Blättern der gleichen Pflanze meist Tröpfchen, erstere orangefarben, letztere immer gelb. Sollte das „Öl" von der Kalilauge nicht angegriffen werden?

Fig. 161. Xanthocarotinkristalle, mit alkoholischer Kalilauge aus Blättern erhalten (Tunmann)

v. Wisselingh empfiehlt, mit der Lauge mehrere Tage hintereinander einige Stunden auf 70—80° zu erwärmen.

[1]) H. Molisch, Die Kristallisation und der Nachweis des Xanthophylls (Carotins) im Blatte, Ber. deutsch. bot. Ges., 1896, XIV, S. 19.

Die Kalimethode kann auch bei Algen zur Anwendung kommen, doch scheiden sich die Xanthocarotine auf der Oberfläche der Zellen ab (F. G. Kohl, Lit. S. 268, 1). Bei Florideen wurde die Methode von H. Kylin erprobt (Zeitschr. phys. Chem., 1911, LXXIV, 105), der Carotin auch makrochemisch aus Ceramium rubr. darstellte.

Über verschiedene Form und Farbe der Kristalle s. v. Wisselingh (l. c. 783, 3).

2. Die Säuremethode von Frank-Tschirch. Grüne Blattstücke zeigen nach längerem Verweilen in verdünnten wässeriger Säurelösungen und nachfolgendem Auswaschen mit Wasser rotviolette oder rötliche und besonders braune Kristalle (Carotin) und gelbrote ölartige Massen (Xanthophylle ?). Mit diesem Verfahren hat Tammes[1]) die Verbreitung des Carotins im Pflanzenreiche verfolgt und 1—10 proz. wässerige Lösungen von Weinsäure, Oxalsäure, Salzsäure, ferner 1 proz. Chromsäure, 1—2 proz. Fluorwasserstoffsäure u. a. benutzt. Oft genügt bereits eine mehrstündige Einwirkung der Säuren, stets sind die Kristalle nach 2tägiger Säurebehandlung der Blätter gebildet. Nach Tswett[2]) ist Aufhellen der Blattstücke mit konzentrierter wässeriger Resorcinlösung zu empfehlen. Neben den Kristallen treten noch dunkelbraune Massen hervor. Folgt auf die Säurebehandlung eine mehrtägige Kalibehandlung, so werden die braunen Massen gelöst und es verbleiben in den Zellen nur rote Kristalle und gelbe Tröpfchen.

Da die Carotinoide durch Säuren zersetzt werden, so steht die Säuremethode der Kalimethode meist nach (Molisch, v. Wisselingh).

3. Bei der Resorcin-Methode von Tswett (Lit. S. 780, 1) gelangen die Stücke in eine konzentrierte wässerige Resorcinlösung (10—12 Resorcin + 10 Wasser), wodurch Lipoide und plasmatische Proteinsubstanzen gelöst werden. Bei Zusatz von 1 proz. zweibasischem Kaliumphosphat entstehen Chloroglobinkugeln, in neutraler Lösung bilden sich nach wenigen Minuten, in alkalischer Lösung nach längerer Zeit, gelbe Kristallbüschel und rote Kristalle.

Bei am gleichen Material (Adiantum, Strychnos, Hedera u. a.) ausgeführten Vergleichsversuchen erwies sich die Kalimethode am sichersten (Fig. 161). Die kristallinische Natur der Ausscheidungen tritt zuweilen erst nach gründlichem Auswaschen mit Wasser klar hervor (polarisiertes Licht, in dem die Kristalle gelb bis braunrötlich aufleuchten, ist zu empfehlen).

Um die Carotinoide in den Zellen auskristallisieren zu lassen,

[1]) A. Tschirch, Unters. über d. Chlorophyll, 1884, S. 92 u.: Tine Tammes, Vorkommen d. Carotins i. Pflanzenr., Flora, 1900, LXXXVII, S. 205.

[2]) M. Tswett, Üb. d. makro- und mikrochemischen Nachweis des Carotins, Ber. deutsch. bot. Ges., 1911, XXIX, S. 630.

wandte v. Wisselingh noch an: Pyridin, Picolin, Lutidin, Piperidin, in einigen Fällen auch Weingeist und Erwärmen mit Glyzerin oder einer 10proz. Lösung von Kaliumhydroxyd in Glyzerin auf 140°.

Molisch (Pflanzenbiologie in Japan, S. 240) erhielt kristallisiertes Karotin, als er die rote Ölkugeln enthaltenden Haare des Samen-Anhangs von Clerodendron Thompsonii Balf. mit Chloroform behandelte.

Bei den in der Natur auftretenden und bei den nach den genannten Methoden abgeschiedenen Xanthocarotinkristallen dienen zur Charakteristik folgende Reaktionen: Konzentrierte Schwefelsäure[1]) färbt violett, dann indigoblau; aus der Lösung fallen bei Wasserzusatz grünliche Flocken; nach v. Wisselingh genügt zur Erzielung der Blaufärbung in den meisten Fällen eine 66½—76proz. Schwefelsäure; doch verhalten sich die manchmal in derselben Zelle ausgeschiedenen verschiedenen Kristalle gegen Schwefelsäure verschieden. In Jodchloral (5 + 2 Wasser, Jod im Überschuß) werden die Kristalle schmutziggrün. Phenol- und Thymolsalzsäure (konzentrierte Säure mit etwas Phenol) färben tiefblau.

Mit 50proz. Salpetersäure entsteht vorübergehende blaue oder grünlichblaue Färbung, ähnlich mit Bromwasser; mit Jodjodkalium färbt sich nur ein Teil der Carotinoide (dunkelgelbgrün, bisweilen dunkelgelb oder blaugrün, in einzelnen Fällen blau- oder rotviolett), so daß Jodjodkalium in vielen Fällen zur Unterscheidung verschiedener Carotinoide geeignet ist. Blaufärbung erhält man auch mit konzentrierter Selensäure, mit der gesättigten Lösung von Antimonchlorür oder Zinkchlorid in 25proz. Salzsäure und beim Erwärmen mit einer gesättigten Lösung von wasserfreiem Aluminiumchlorid in rauchender Salzsäure (v. Wisselingh).

Die Kristalle sind leicht löslich in Benzol, Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, fetten und ätherischen Ölen, unlöslich in Wasser, verdünnten Säuren, Alkalien und Glyzerin, fast unlöslich in Weingeist, sowie unlöslich in Eisessig und Chloralhydrat. Sie lösen sich aber in den drei letztgenannten Reagentien beim Erwärmen. Die Schwefelkohlenstofflösung ist blutrot, die übrigen Lösungen erscheinen gelb bis orange. Verwechslungen mit Phytosterinkristallen sind leicht zu erkennen. Phytosterin wird mit Schwefelsäure blutrot. „Entfärbt man die Kristalle, indem man kleine kristallführende Gewebestücke für 1—3 Minuten in

[1]) Das Verhalten der Kristalle in Schwefelsäure verschiedener Konzentration wurde von Borodin studiert (Mélang. biol., Bull. Ac. St. Pétersb., 1883, XI, 485), später von v. Wisselingh (l. c.), die allgemeinen Reaktionen besonders von A. Arnaud (Compt. rend., 1886, CII, 1119 u. 1889, CIX, 911), A. Meyer, Kohl, v. Wisselingh u. a.

Bromwasser einlegt, wäscht man dann aus und behandelt die nunmehr farblosen Kristalle mit konzentrierter Schwefelsäure, so tritt keine Färbung ein" (Molisch; bei Carotinen), während Phytosterinkristalle selbst nach mehrtägigem Liegen in Bromwasser bei Zusatz von Schwefelsäure blutrot werden. So sollen die im Innern des Pollens von Verbascum thapsiforme sich nach mehrtägiger Glyzerinbehandlung ausscheidenden orangeroten Kristalle Phytosterin oder Fett sein[1]).

Lycopin

Das Lycopin kommt außer in den Tomaten, in denen es von Willstätter und Escher entdeckt wurde, in einer Anzahl von Früchten und Samen vor; es wird in den Chloroplasten begleitet von Carotin, Xanthophyll und den verschiedenfarbigen Lycopinoiden. Einzelne Pflanzen, z. B. mehrere Palmenarten, häufen Lycopin in den Chromoplasten in sehr reinem Zustande, gewöhnlich in Form großer prismatischer Kristalle an. In den Früchten findet es sich vorzugsweise in den die Samen umgebenden Teilen des Endokarps. Der Nachweis des Lycopins wird folgendermaßen erbracht[2]): Gewebe, die nicht wasserreich sind, werden in einem Mörser mit 95proz. Weingeist zerrieben. Man filtriert und kocht den Rückstand mit absolutem Alkohol, bis dieser tieforange gefärbt ist. Man filtriert noch heiß in eine Kristallisierschale. Die im Verlauf einiger Stunden entstandene kristallinische Masse wird nochmals aus Alkohol kristallisiert. Die so erhaltenen Kristalle werden mit Eisessig gewaschen.

Wasserreiche Gewebe werden zuerst mit Wasser ausgekocht. Der unlösliche Rückstand wird abfiltriert und zwischen Filtrierpapier getrocknet.

Die Lycopinoide sind in Eisessig löslich, in Weingeist leichter als Lycopin. Ihre Reaktionen sind zum Teil dieselben wie die des Lycopins und Carotins. Mit Schwefelsäure blaue Lösung; rauchende Salpetersäure gibt vorübergehende blaue oder blauviolette Färbung.

Lycopin ist in den Chromatophoren immer durch gelbe Pigmente begleitet, die Lycopinoide sind Zwischenglieder zwischen Lycopin und Carotin. Lycopin und die Lycopinoide sind Oxydationsprodukte des Chlorophylls und bilden sich an dessen Stelle bei der herbstlichen Zerstörung des Chlorophylls. Bei Coniferen, Selaginellaceen und Gnetum bildet sich außerdem Rhodoxanthin (von den Lycopinoiden durch leichte Löslichkeit in konzentrierter Ameisensäure verschieden.)

---

[1]) G. Poirault et G. Bertrand, Mat. col. d. poll., Compt. r., 1892, CXV, S. 828.

[2]) W. Lubimenko, Recherches sur les pigments des chromoleucites, Compt. rend. Acad. sciences, Paris, 1914, CLVIII, S. 510.

Fucoxanthin

Aus Methanol ziegelrotes Pulver, unter dem Mikroskop bernsteingelbe, makrochemisch bläulich glänzende braunrote Prismen von monoklinem Habitus, aus Weingeist oder Azeton unter Ausschluß von Luft bläulich glänzende dunkelrote, in der Durchsicht unter dem Mikroskop zitronengelbe bis rote Tafeln.

F. 159,5—160,5° (korr.). Reichlich löslich in Äthylalkohol, ziemlich leicht in Schwefelkohlenstoff, ziemlich schwer in Äther.

Mit konzentrierter Schwefelsäure entsteht dieselbe Blaufärbung wie bei den anderen Carotinen.

Die span- oder blaugrüne Färbung, die die Phäophyceen in 2proz. wässeriger Salzsäure annehmen, ist nach Molisch auf das Fucoxanthin zurückzuführen.

Rhodoxanthin[1])

Läßt sich am besten aus den Blättern von Reseda odorata gewinnen. Gibt mit methylalkoholischer Kalilauge eine in schwarzen Würfeln kristallisierende Verbindung. Seine rote Farbe verschwindet, wenn es in saurer Lösung durch Zinkstaub reduziert wird.

Läßt sich entgegen Molisch und Prát nicht mit der Kalimethode nachweisen.

Farbstoff von Rhodochytrium

Der rote Farbstoff ist nach Lagerheim Hämatochrom oder ein verwandtes Lipochrom. Mit Jodjodkalium grün, mit Schwefelsäure und Salpetersäure blau, bei letzterer allmählich verblassend. Löslich in Schwefelkohlenstoff.

Lutein

Vom Lutein, einem Farbstoff des Eidotters ist zuerst von Schunck gezeigt worden, daß es mit den pflanzlichen Farbstoffen der Xanthophyll-Gruppe verwandt ist.

R. Kuhn und A. Winterstein fanden, daß zu den gelben Begleitern des Chlorophylls außer Carotin und Xanthophyll auch das Lutein gehört; es findet sich auch in der Mehrzahl der gelben Blüten, deren Farbstoff auf Grund spektroskopischer Untersuchungen als „Xanthophyll" beschrieben war und zwar vorzugsweise mit Palmitinsäure verestert. Der Dipalmitinsäure-Ester des Luteins (feine rote Nadeln F. 92) wird nach seinem ersten Nachweis in Helenium autumnale als Helenien bezeichnet (Die Naturwissenschaften 1930, XVIII, S. 754).

Anthophaein

Anthophaein, ein brauner im Zellsaft gelöster Farbstoff (Umwandlungsprodukt des Chlorophylls?)[2]), bedingt die schwarzen Flecken an den Flügeln der Derivate sind nach Keilin wenigstens teilweise die Peroxydasen des Organismus

[1]) Th. Lippmaa, Das Rhodoxanthin und seine Eigenschaften usw., Schriften d. naturforsch. Gesellsch. Tartu (Dorpat), 1925, XXIV, S. 103.

[2]) M. Moebius, Das Anthophaein, der braune Blütenfarbstoff, Ber. deutsch. bot. Ges., 1900, XVIII, S. 341 u.: Beitr. z. Blütenbiol. u. z. Kenntn. d. Blütenfarbstoffe, Ber. deutsch. bot. Ges., 1912, XXX, S. 365. — Clamor Marquardt (Lit. S. 342) u. F. Hildebrand (Lit. S. 344,$_5$).

Blume von Vicia faba, die Braunfärbung der Blumenblätter von Delphinium-Arten (Lit. S. 564, 2). Im allgemeinen tritt der Farbstoff nur in vereinzelten Fällen auf, besonders in Orchideen (Coelognye-Arten, Maxillaria (Fruchtknoten), Pholidota artic., Platyclinis glum.).

Anthophaein ist nach Moebius in Weingeist, Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff unlöslich, löst sich aber leicht in Wasser und wird aus der wässerigen Lösung durch verdünnte Säuren und Alkalien gefällt. Der Farbstoff nimmt durch Essigsäure eine intensive Färbung an, durch Alkalien erfolgt kein Farbenumschlag (Unterschied von Anthocyan). Nach Schlockow bleibt Anthophaein unverändert, wenn die Blüten einige Tage in Alkohol gelegen haben, was aus der Unlöslichkeit des Farbstoffes in Alkohol hervorgeht.

Phaeophyll (?)

Braunes Chlorophyll, Phaeophyll, sollen die Chromatophoren der Orchidee Neottia nidus avis führen. Lebende Pflanzen werden beim Absterben grün. Auch beim Behandeln lebenden Materials oder von Präparaten solchen Materials mit Weingeist, Äther[1]), heißem Wasser, Wasserdämpfen[2]), Benzol, Schwefelkohlenstoff[3]), wässerigen Lösungen von Aldehyden und aldehydartigen Körpern, Kaliumnitrit und Ferrosulfat geht die braune Farbe in Grün über. Durch die angeführten Reagentien wird Chlorophyll, das in der lebenden Pflanze nicht auftritt, aus dem Phaeophyll gebildet, wie Schimper[4]) meint, der auch in der Fruchtwand in den Chromatophoren den braunen Farbstoff in nadelförmigen Kristallen antraf.

Die Phaeophyll-Frage bedarf noch der Aufklärung. Vgl. R. Willstätter und H. J. Page, Annal. d. Chem., 1914, CCCCIV, S. 242.

Derivate und Verwandte des Blutfarbstoffs

Hämin — identisch mit tierischem Hämin — wurde aus Hefe kristallisiert gewonnen (H. Fischer u. F. Schwerdtel, Zeitschr. physiol. Chem. 1928, CLXXV, S. 248) und kommt auch in höheren Pflanzen vor (H. Fischer u. K. Jordan, ebenda, 1930, CXC, S. 75). Porphyrine wurden in zahlreichen Pflanzen aufgefunden.

Cytochrom kommt in Bakterien, Hefe und höheren Pflanzen vor (in farblosen Pflanzenteilen neben einer Modifikation). Beide oxydieren sich in alkalischer Lösung durch den Luftsauerstoff zu Hämochromogenen. Cytochrom und seine

---

[1]) J. Wiesner, Unters. über die Farbstoffe einig. für chlorophyllfrei gehalt. Phanerogam., Jahrb. f. wiss. Bot., 1872, VIII, S. 575.

[2]) H. Molisch, Üb. d. braun. Farbstoff d. Phaeophyceen u. Diatomeen, Bot. Ztg., 1905, LXIII, S. 131.

[3]) O. Lindt, Umbildung d. braun. Farbstoffkörp. in Neottia nidus avis zu Chlorophyll, Bot. Ztg., 1885, XLIII, S. 825.

[4]) A. F. W. Schimper, Unters. üb. d. Chlorophyllkorn u. die ihnen homol. Gebilde, Jahrb, f. wiss. Bot., 1885, XVI, S. 108.

Derivate sind nach Keilin wenigstens teilweise die Peroxydasen des Organismus und Katalysatoren der intrazellularen Atmung. (D. Keilin, On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast and higher plants, Proceed. Roy. Soc. London, 1925, XCVIII, S. 312.)

Euler, Fink und Hellström stellten fest, daß in der Hefe der Gehalt an Cytochrom (Hämochromogen) ihrer katalytischen Wirkung parallel geht (Zeitschr. physiol. Chem. 1927, CLXIX, S. 10 und 1930, CXC, S. 189). Ein Vergleich zwischen der Intensität des Cytochromspektrums und den in der Hefe nachgewiesenen Häminmengen zeigt, daß das Hämin als wesentlicher Bestandteil in das Cytochrom eingehen muß (Euler u. Hellström).

Besondere Algenfarbstoffe

Rhodophyceen-(Florideen-)Phykoerythrin (R-Phykoerythrin)

Die Chromatophoren der Florideen führen neben Chlorophyll einen roten, mit Wasser ausziehbaren Farbstoff, das Phykoerythrin Kützings (Phycologica generalis, Leipzig 1843). Der Farbstoff wird dargestellt, indem man die, bei Lichtabschluß und bei 35° gewonnenen wässerigen Auszüge (Nitophyllum punct. u. a.) langsam verdunsten läßt. Es scheiden sich rote wasserlösliche Kristalle ab. Der Farbstoff liegt in Form einer Eiweißverbindung vor (A. Hansen) und wird daher aus wässeriger Lösung durch Neutralsalze ausgesalzen. Beim Einlegen lebender Algen in Öl oder Äther wird Chlorophyll ausgezogen, während Phykoerythrin in den Chromatophoren verbleibt[1]).

Über das Phykoerythrin der Cyanophyceen s. S. 794.

Lemberg[2]) gewann aus japanischen und deutschen Florideen ein Phykoerythrin und zwei Phykocyane. Es sind metallfreie globulinartige Chromoproteide, deren Farbstoffkomponente höher oxydierte gallenfarbstoffähnliche Chlorophyllderivate sind. Näheres über die Darstellung s. Annal. Chem., 1928, CCCCLXI, S. 61.

Die Pigmente der Florideen sind Sensibilatoren für das vom Chlorophyll wenig absorbierte Licht und ermöglichen es den Algen, in einer Meerestiefe zu gedeihen, in der grüne Pflanzen nicht mehr bestehen können.

Durch Pepsinspaltung der Florideen-Chromoproteide erhält man Verbindungen von Gallenfarbstoffen oder ihnen nahe verwandten Pyrrolfarbstoffen mit Eiweißbruchstücken. Spaltet man sie mit Salzsäure, so erhält man in Chloroform lösliche, in Wasser bei neutraler

[1]) J. Klein, Krist. einig. Florideen, Flora, 1871, LIV, 161 u.: Krist. d. Meeresalg., Jahrb. wiss. Bot., 1882, XIII, 23. — F. Schütt, Phykoerythr., Ber. bot. Ges., 1888, VII, 36 und 305. — A. Hansen, Stoffb. b. Meeresalg., Mitt. zool. Stat. Neapel, 1893, XI, 255. — H. Molisch, D. Phykoerythr., s. Kristallisierbark. u. chem. Nat., Bot. Ztg., 1894, LII, 177.

[2]) R. Lemberg, Rotalgenpigmente, Chem. Ztg., 1929, LIII, S. 421. — Derselbe, Die Chromoproteide der Rotalgen, I, Annal. Chem., 1928, CCCCLXI, S. 46; II, ebenda CCCCLXXVII, S. 195.

Reaktion unlösliche Stoffe mit dem Verhalten der Gallenfarbstoffe (Lemberg).

Cramer fand beim Einlegen lebender Algen in konzentrierte Kochsalzlösung, später auch in Weingeistmaterial, Cohn auch in verschlossenen Deckglaspräparaten (Seewasserglyzerin) rote Kristalle, die nach längerer Zeit farblos wurden, dann Eiweißreaktion gaben und Rhodospermin genannt wurden[1]). Um Phykoerythrinkristalloide, die sich übrigens auch bei im Meerwasser abgestorbenen Algen vorfinden, innerhalb der Zelle zur Ausscheidung zu bringen, bringt man lebende Algen (Nitophyllum, Ceramium, Porphyra, Gelidium u. a.) auf mehrere Tage in eine 10proz. Kochsalzlösung, der einige Tropfen Schwefelkohlenstoff zugesetzt sind. Der Schwefelkohlenstoff tötet die Algen rasch, fördert den Austritt des Farbstoffes aus den Chromatophoren in den Zellsaft und hindert das Faulen der toten Algen. Man kann die Kristallbildung unter dem Mikroskop verfolgen beim Einlegen von kleinen Thallusstücken auf den Objektträger in 10proz. Chlornatrium, Magnesiumsulfat oder Ammoniumsulfat. Nach einigen Stunden beginnt die Kristallisation; es entstehen entweder zahlreiche kleine oder einige größere Kristalle. Polysiphonia-Arten und Antithamnion geben keine Kristalloide. Bruns (Lit. S. 10, 3) gelang die Kristallisation mit konzentrierter Kochsalzlösung in Meerwasser und mit 1proz. Formaldehydlösung bei Wrangelia, Nemastoma cervic. und Vidalia. Kylin[2]) benutzt eine 5proz. Lösung von Kochsalz oder Ammoniumsulfat mit Toluolzusatz.

Die Phykoerythrinkristalloide haben die Form hexagonaler Prismen; zuweilen sind sie nadelförmig und schollenartig. Sie werden bis 50 μ lang (die makrochemisch dargestellten sogar bis 480 μ lang und bis 12 μ breit), sind unlöslich in Weingeist, Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Olivenöl und Terpentinöl. Die frisch gefällten Kristalloide sind in Wasser löslich, mit dem Alter nimmt ihre Löslichkeit in Wasser ab. In Glyzerin lösen sie sich langsam, jedoch nicht mehr nach vorausgegangener Behandlung mit Weingeist. Sie verquellen unter Entfärbung bis zum Verschwinden in verdünnter Kalilauge, Natronlauge, Ammoniak, Barytwasser. „Von starker Natronlauge werden sie erst violett, dann blau, blaugrün, grün und zuweilen (Porphyra) braungelb gefärbt" (Gaidukov)[3]),

[1]) C. Cramer, Rhodospermin, ein krist., quellb. Körp. im Zellinh. versch. Florid., Natf. Ges. Zürich, 1861, VII, 350. — F. Cohn, Beitr. z. Phys. d. Phykochrom. u. Florid., M. Schultzes Arch., 1867, III, S. 1.

[2]) H. Kylin, Über die roten und blauen Farbstoffe der Algen, Zeitschr. f. physiol. Chem., 1912, LXXVI, S. 396.

[3]) N. Gaidukov, Zur Farbenanalyse der Algen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1904, XXII, S. 27.

von konzentrierter Kalilauge blau, blaugrün, malachitgrün. In konzentrierten Säuren zerfließen sie, in verdünnten Säuren (1 + 6 Wasser) werden sie violett bis ziegelrot. Entfärbte Kristalloide (das Entfärben gelingt leicht, indem man die Präparate mehrere Tage dem direkten Sonnenlichte aussetzt, Bromdampf greift die Kristalloide zu sehr an) geben Eiweißreaktionen. Durch Erhitzen auf 100° und längere Weingeistbehandlung werden sie unlöslich.

Über weitere Eigenschaften s. Lemberg, Annal. Chem., 1928, CCCCLXI, S. 79.

Rhodophyceen-(Florideen-)Phykocyan (R-Phykocyan)

Darstellung s. R. Lemberg, Annal. Chem., 1928, CCCCLXI, S. 61.

Das Phykocyan von Ceramium rubrum bildet rhombenförmige Blättchen (Flächenwinkel 100° und 80°), die Dichroismus (blauviolett) zeigen. Sie sind doppelbrechend. Das Phykocyan der Bangiacee Porphyra tenera Kjelm. (Nori-Phykocyan) bildet flache längliche Blättchen bis flache Nadeln, oft längsgespalten und gekerbt mit schräger Endigung und oft nach einer auf dieser senkrecht stehenden Ebene verzwillingt. Daneben finden sich rhombische Blättchen. Das Nori-Phykocyan ist in Wasser leichter löslich als das aus Ceramium. Gegen Lauge ist Phykocyan unter Auftreten verschiedener Farben unbeständig. In konzentrierter Schwefelsäure ist es mit blauvioletter Farbe löslich. Die wässerige Lösung ist tiefblau mit dunkelkarminroter Fluoreszenz (Fluoreszenzstreifen in 0,15proz. Lösung bei 690—630 $\mu\mu$). Bromwasser vernichtet die Fluoreszenz und entfärbt rasch. Mit Ammoniak oder Ammonsulfid bleicht die Farbe rasch aus.

Das Nori-Phykocyan ist wahrscheinlich identisch mit dem von Kylin aus Batrachospermen und dem von Boresch aus Cyanophyceen erhaltenen „grünblauen" Phykocyan (Lemberg).

Doch gibt es auch Nori-Sorten, die Ceramium-Phykocyan enthalten (Lemberg)[1].

Phaeophyceenfarbstoffe

Die Braunalgen enthalten Chlorophyll und zwar fast ausschließlich die Komponente a, ferner Carotin, Xanthophyll und Fucoxanthin (s. S. 789). Ein besonderer brauner Farbstoff, das Phykophaein der früheren Botaniker, existiert nicht. (Willstätter und Page)[2]. Über Phaeophyll s. S. 790.

---

[1]) R. Lemberg, Die Lichtextinktionen der Algen-Chromoproteide, Bioch. Zeitschr., 1930, CCXIX, S. 255; vgl. auch The Svedberg und T. Katsurai, Die Molekulargewichte des Phykoerythrins und Phykocyans von Porphyra tenera und des Phykocyans von Aphanizomenon Flos Aquae, Journ. Amer. Chem. Soc., 1929, LI, S. 3573.

[2]) R. Willstätter u. H. J. Page, Untersuchungen über das Chlorophyll. Über die Pigmente der Braunalgen. Annal. d. Chem., 1914, CCCCIV, S. 237.

Diatomeenfarbstoffe

Die braungelben Farbstoffe der Diatomeen (Diatomin) sind noch nicht genügend erforscht; sie stimmen vielleicht mit den Farbstoffen der Peridineen (Pyrrophyll, Schütt) überein. Nach Molisch ist das Diatomin wahrscheinlich Carotin, die braune Farbe werde durch Phaeophyll (s. oben) hervorgerufen. Fügt man zu einer unter Deckglas liegenden Diatomeenmasse absoluten Alkohol zu, so scheiden sich beim Verdunsten des Alkohols gelbliche Tropfen und nahe dem Deckglasrande grüne Tropfen aus. Die gelben Tropfen werden nach dem Eintrocknen durch Salzsäuredampf blau gefärbt. Durch nicht zu verdünnte wässerige Lösungen von Propyl- oder Benzaldehyd werden lebende Algen nach einiger Zeit grün.

Über das Marennin, den blauen Farbstoff von Navicula ostrearia ist nichts Näheres bekannt.

Cyanophyceen-(Schizophyceen-)Phykoerythrin (C-Phykoerythrin)

Viele Schizophyceen enthalten neben dem blauen Farbstoff (Kylins Phykocyan) noch einen roten Farbstoff mit orangegelber Fluoreszenz und nur einem Absorptionsmaximum im Grün zwischen den Frauenhoferschen Linien D und E (Schizophyceen-Phykoerythrin).

Von Boresch[1]) in Phormidium Retzii (Ag.) Gom. var. nigro-violacea Wille entdeckt, kommt C-Phykoerythrin noch in anderen Cyanophyceen vor, sowie in der Protococcale Palmellococcus miniatus Chod. var. porphyrea Wille vor.

Nach Danilow besitzen die Cyanophyceen außer dem Phykoerythrin von Boresch noch einen zweiten roten Farbstoff mit einem Absorptionsstreifen zwischen 580 und 560.

Nach Wille[2]) ist in Phormidium persicinum echtes Florideenphykoerythrin vorhanden.

Cyanophyceen-Phykocyan (C-Phykocyan)

Die Chromatophoren der Cyanophyceen führen neben Chlorophyll einen blauen wasserlöslichen Farbstoff, das Phykocyan. Man nimmt mehrere Phykocyane[3, 4]) an, die sich durch die Farbe ihrer wässerigen Lösungen, ihr spektroskopisches Verhalten und ihre Kristallisationsfähigkeit unterscheiden (H. C. Sorby nahm schon 3 Phykocyane an [blue, purple, pink], s. auch H. Molisch [Sitzgsb. Wien. Ak., 1906, CXV_1, 795] u. H. Kylin, Lit. S. 792, 2). Seit Hansen (Lit. S. 791, 1)

---

[1]) K. Boresch, Die wasserlöslichen Farbstoffe der Schizophyceen, Bioch. Zeitschr., 1921, CXIX, S. 167. — Derselbe, Phykoerythrin in Cyanophyceen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1921, XXXIX, S. 93; Derselbe, Über die Pigmente der Alge Palmellococcus miniatus Chod. var. porphyrea Wille, ebenda, 1922, XL, S. 288.

[2]) N. Wille, Phykoerythrin bei den Myxophyceen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1922, XLI, S. 188.

[3]) C-Phykocyan kommt auch in Rhodophyceen und Bangiaceen vor.

[4]) Kylin (Zeitschr. physiol. Chem., 1911—1912, LXXVI, S. 396) unterscheidet ein blaugrünes, blaues und blauviolettes Phykocyan.

werden die Phykocyane als (meist kristallisierbare) Farbstoffe eiweißartiger Natur betrachtet (auch H. Molisch, Bot. Ztg., 1895, LIII, 131). Makrochemisch erhält man sie aus dem bei Lichtabschluß erhaltenen wässerigen Auszuge (Oscillaria leptotricha), den man mit Ammonsulfat aussalzt und verdunsten läßt (5—12 μ lange Kristalle des monoklinen Systems. Kombination von Prisma und Klinodoma, Becke).

Die frisch gefällten Phykocyankristalle sind von weicher Konsistenz, indigoblau, löslich in Wasser, Glyzerin, verdünnten Alkalien, unlöslich in verdünnten Säuren, Weingeist, Äther, Benzol u. a. Salpetersäure färbt karminrot, dann gelb, Schwefelsäure löst, Salzsäure und Eisessig bilden schaumige Tropfen. Durch Weingeistbehandlung werden sie unlöslich in Wasser. Entfärbte Kristalle (Bromwasser, direktes Sonnenlicht, 2 Minuten) geben Eiweißreaktionen (Jod, Eosin). Die Lokalisation des Farbstoffes kann unter Deckglas mit konzentrierter Essigsäure festgestellt werden. Die dem Wasser entnommenen Algen werden mit Filtrierpapier schnell abgetupft und in Essigsäure gebracht. Das Chlorophyllgrün bildet am Deckglasrande Chlorophyllankristalle, zwischen den Algenfäden erscheinen orangerote Carotinkristalle, das Phykocyan bleibt in der Zelle und ist mikroskopisch gut zu sehen, besonders bei übereinandergelagerten Fäden.

Danilow (Nachr. a. d. bot. Hauptgarten Petersburg, 1922) nimmt zwei Phykocyane an, ein grünblaues (Absorptionsstreifen zwischen 640 und 620) und ein violettblaues (Absorptionsstreifen zwischen 620 und 600).

Farbstoffe der Peridineen[1])

Der spezielle Peridineenfarbstoff ist das Peridinin. Außerdem kommen vor: Phycopyrrin und Peridineen-Chlorophyllin. Gelegentlich scheint auch Phycocyan aufzutreten.

Farbstoffe der Flagellaten

Chromulina Rosanoffii, die Goldalge, enthält außer Chlorophyll und Xanthophyll das wasserlösliche Phycochrysin (Gaidukow)[2]).

Die Membranfarbstoffe der Moose

Die Färbungen der Moose werden, soweit nicht im Zellsaft gelöste Anthocyane oder Chromatophoren mitwirken, durch Membranfarbstoffe verursacht.

[1]) Fr. Schütt, Über Peridineen-Farbstoffe, Ber. deutsch. bot. Ges., 1890, VIII, S. 9; auch H. Kylin, Über die carotinoiden Farbstoffe der Algen, 1927, CLXVI, S. 68.

[2]) N. Gaidukow, Über das Chrysochrom, Ber. deutsch. bot. Ges., 1900, XVIII, S. 331.

Herzfelder[1]) teilt die Membranfarbstoffe der Moose in zwei große Gruppen. Die erste Gruppe umfaßt die Membran-Anthocyane. Es sind rote Farbstoffe mit violettem Ton, die mit Säuren hellrot werden. Ammoniak bewirkt Umschlag nach blau.

Die zweite Gruppe umfaßt die gelben, braunen und braunroten Moosfarbstoffe. Sie werden durch Säuren heller, meist gelb, durch Alkalien tiefbraun oder orange. Sie scheinen den Phlobaphenen (s. S. 395) nahezustehen, dafür spricht der Umstand, daß die Färbung in einzelnen Fällen durch Alkalien hervorgerufen werden kann.

Der Farbstoff der roten Sphagnen kann durch HCl-haltigen Weingeist (ca. 4 ccm HCl auf 100 ccm 96proz. Weingeist) durch einstündiges Erhitzen bei 120° (etwa 4 Atm. Druck) herausgelöst werden.

Man kann den Farbstoff kristallisiert erhalten, wenn man intensiv rote Stämmchenstücke von Sphagnum rubellum in 2 % HCl enthaltendem 96proz. Weingeist auf dem Wasserbad erhitzt, bis die Flüssigkeit nahezu verdampft ist und dies mehrmals wiederholt. Man findet dann meist in den Zellen tiefkarminrote Kristallnadeln, in Pinseln oder Büscheln oder Sphäriten. Sie zerfließen in Wasser und lösen sich in verdünnter Kalilauge mit rein blauer Farbe.

Farbstoffe von Pilzen

Thelephorsäure

wurde von Zopf aus Thelephora- und Hydnum-Arten gewonnen[2]).

Sie ist nach Kögl, Erxleben und Jänecke (Annal. Chem. 1930, 482, S. 105) eine von einem Trioxyphenanthrenchinon abzuleitende ungesättigte Säure.

Aus heißgesättigter weingeistiger Lösung blaue Kriställchen und Drusen. In Weingeist mit weinroter Farbe löslich, in Wasser und selbst in konzentrierter Schwefelsäure unlöslich. Ätzkalien und Ammoniak färben blaugrün, Ammonkarbonat und Soda blau, alle ohne zu lösen. Inkrustiert die Membranen.

Xanthotrametin

In Trametes cinnabarina (Zopf)[3]).

Aus heißem Weingeist rote Drusen oder spindelförmige Einzelkristalle. Schwach pleochroitisch (rotbraun-rötlichgelb). Konzentrierte Salpetersäure bewirkt tief orangerote, konzentrierte Salzsäure orangegelbe, konzentrierte Schwefelsäure rosarote, Eisessig und Ätzalkalien gelbe Lösung.

Das Xanthotrametin bildet auf den Hyphen — neben einer gelben Harzsäure — ziegelrote, körnige Überzüge.

Eine Anzahl von Pilzfarbstoffen ist in den letzten Jahren näher untersucht worden. Das Atromentin von Paxillus atromentosus hat sich als ein 2,5-Di-(p-

[1]) H. Herzfelder, Beiträge zur Frage der Moosfärbungen, Beihefte z. bot. Centralbl., 1921, XXXVIII, Abt. 1, S. 355.

[2]) W. Zopf, Über Pilzfarbstoffe, Botan. Ztg., 1889, XLVII, S. 69.

[3]) Derselbe, ebenda S. 85.

oxyphenyl)-3,6-dioxybenzochinon erwiesen (Fritz Kögl u. Mitarbeiter)[1]), der orangegelbe Farbstoff von Dermocybe sanguinea ist identisch mit Frangula-Emodin, der rote desselben Pilzes ist Tetraoxy-methoxy-β-methyl-anthrachinon (Kögl u. Postowsky)[2]), die Polyporsäure aus einem an trocknen Eichen wachsenden Braunschwamm, der sich beim Befeuchten mit verdünnter Ammoniaklösung tiefviolett färbt[3]) und dem wahrscheinlich damit identischen Polyporus rutilans (Pers.) ist 3,6-Dioxy-2,5-diphenyl benzochinon (1,4) (Fritz Kögl)[4]). Noch nicht erforscht ist die Konstitution des Xylindeins, des von Peziza aeruginosa erzeugten Farbstoffs des grünfaulen Holzes (Kögl u. v. Taeuffenbach)[5]). Dagegen ist es Kögl u. Erxleben[6]) gelungen, die Konstitution des Musearufins, des wahrscheinlich in glykosidischer Bindung auftretenden Farbstoffs des roten Fliegenpilzes zu ermitteln. Er ist eine dreiwertige ungesättigte Säure, die sich vom Diphenylbenzochinon ableitet.

Phytomikrochemisches liegt über alle diese Stoffe nicht vor.

Das Sclererythrin kommt neben anderen Farbstoffen im Mutterkorn, dem Sclerotium von Claviceps purpurea vor. Es ist ein rotes amorphes Pulver, unlöslich in Wasser, löslich in absolutem Alkohol; ferner in konzentrierter Schwefelsäure mit dunkelvioletter Farbe löslich. Die Lösungen in Kalilauge und Ammoniak werden bald rotviolett.

Das Sclererythrin ist ausschließlich in der Randzone des Sclerotiums lokalisiert.

Über die Farbstoffe der Aspergillaceen und Mucorineen s. A. Blochwitz, Zentralbl. Bakter., Parasitenkunde, II. Abt., 1930, LXXX, S. 201.

Farbstoffe der Bakterien

Auch über die Farbstoffe der Bakterien ist nichts Phytomikrochemisches bekannt. An makrochemischen Arbeiten seien erwähnt:

F. Wrede u. E. Strack, Über das Pyocyanin, den blauen Farbstoff des Bacillus Pyocyaneus, Zeitschr. physiol. Chem., 1924, CXL, S. 1; 1925, CXLII, S. 103; 1928, CLXXVII, S. 177; 1929, CLXXXI, S. 58.

F. Wrede u. O. Hettche, Über das Prodigiosin, den roten Farbstoff des Bacillus prodigiosus, Ber. deutsch. chem. Ges., 1929, LXII, S. 2678.

[1]) Fritz Kögl u. J. J. Postowsky, Untersuchungen über Pilzfarbstoffe I. Über das Atromentin, Annal. d. Chem., 1924, CCCCXL, S. 19 und andere Arbeiten in derselben Zeitschrift.

[2]) Fritz Kögl u. J. J. Postowsky, Über die Farbstoffe des blutroten Hautkopfes (Dermocybe sanguinea Wulf.), Annal. d. Chem., 1925, CCCCXLIV, Seite 1.

[3]) Auch Polyporus rutilans (P.) Fr. färbt sich mit Alkalien violett.

[4]) Fritz Kögl, Die Konstitution des Polyporsäure, Annal. d. Chem., 1926, CCCCXLVII, S. 78.

[5]) Fritz Kögl u. G. v. Taeuffenbach, Über das Xylindein, den Farbstoff des grünfaulen Holzes, Annal. d. Chem., 1925, CCCCXLV, S. 170.

[6]) Fritz Kögl u. H. Erxleben, Über den roten Farbstoff des Fliegenpilzes.

In den Purpurbakterien unterschied man Bakteriochlorin und Bakterioerythrin (Molisch[1]), Buder)[2]); Ljubimenko[3]) fand aber Lycopin (s. S. 788) und einen blauen durch den Luftsauerstoff in Chlorin übergehenden Farbstoff.

Nicht mit dem Bakteriochlorin ist identisch das Bacterioviridin, der Farbstoff der grünen Bakterien (Metzner)[4]).

Nach Molisch erhält man das Bakteriopurpurin, wenn man eine große Flocke oder den Bodensatz einer Reinkultur von Rhodobacillus palustris auf dem Objektträger nach dem Eintrocknen unter dem Deckglas mit Chloroform auszieht. Die zuerst entstehenden roten Tröpfchen liefern zahlreiche lachs- bis bräunlichrote Kristalle. Sie sind meistens nadel- oder spindelförmig, an beiden Enden zugespitzt und flach und können zu stern- oder baumartigen verzweigten Aggregaten zusammentreten.

Sie sind in Wasser unlöslich, in kaltem absolutem Alkohol schwer löslich, in Chloroform und Äther leicht löslich. Mit konzentrierter Schwefelsäure werden sie tiefblauviolett bis indigoblau, mit Salpetersäure vorübergehend blau, mit Jodjodkalium schmutziggrün. Diese Reaktionen sprechen nach Molisch dafür, daß das Bakteriopurpurin ein carotinartiger Stoff ist.

Chlororaphin, ein grüner Farbstoff, der sich, wie Guignard und Sauvageau fanden, in den Kulturen von Bacillus chlororaphis kristallinisch ausscheidet, ist nach Kögl und Postowsky eine Molekülverbindung von Dihydro-phenazin-α-karbonamid und Phenazin-α-karbonamid[5]).

Eiweißkristalloide

Eiweißkristalloide kommen vor: 1. als Einschlüsse des Zellkerns[6]), 2. als Einschlüsse der Chromatophoren (A. Meyer, Lit. S. 44,1; Schimper, Lit. S. 790,4) (und Pyrenoide) und 3. im Cytoplasma und im Zellsaft (in Vakuolen und Aleuronkörnern), aber auch in Milchsäften. Bei Polypodium ireoides und anderen kommen sie

[1]) H. Molisch, Die Purpurbakterien nach neueren Untersuchungen (G. Fischer, Jena, 1907).

[2]) J. Buder, Zur Biologie des Bakteriopurpurins und der Purpurbakterien, Jahrbuch f. wiss. Botanik, 1919, LVIII, S. 525.

[3]) W. N. Ljubimenko, Untersuchungen über die Pigmente der Purpurbakterien, Zeitschr. russ. bot. Ges., 1921, VI, S. 107.

[4]) P. Metzner, Über den Farbstoff der grünen Bakterien, Ber. deutsch. bot. Ges., 1922, XL, S. 125.

[5]) F. Kögl u. J. J. Postowsky, Über das grüne Stoffwechselprodukt des Bacillus chlororaphis, Annal. Chem., 1930, CCCCLXIII, S. 280.

[6]) Zuerst aufgefunden und beschrieben von Radlkofer, Über Kristalle proteinartiger Körper pflanzlichen und tierischen Ursprungs, Leipzig 1859.

gleichzeitig im Zellkern und im Cytoplasma oder im Zellsaft vor[1]. Eiweißkristalle können sich in Alkoholmaterial nachträglich bilden, so im Endosperm der Samen von Loranthus europaeus (Mayr). Die Kristalloide können wieder in den Stoffwechsel einbezogen werden[2]. Eiweißkristalloide führende Pflanzen zeigen bei Kultur in kalkfreier Nährlösung eine vermehrte Bildung und Ansammlung von Kristalloiden; so führt Rivina humilis normal nur Zellkernkristalloide, bei kalkfreier Kultur aber auch im Zellsaft und bei Veronica chamaedrys, die normal ebenfalls nur im Zellkern Kristalloide hat, sind sie dann auch in den Chromatophoren[3]. Die physikalisch-kristallographischen Eigenschaften der Kristalloide wurden von Naegeli und Schimper studiert (s. Aleuron).

Vgl. dazu A. Meyer, Morphologische und physiologische Analyse der Zelle usw., S. 46ff., daselbst (S. 52) auch eine Liste über die Verbreitung von Eiweißkristalloiden.

Solla[4]) kommt für die Eiweißkristalloide von Albuca zu der Ansicht, daß sie aus Globulinen bestehen und ist der Meinung, daß die Kernkristalloide Produkte des Kernstoffwechsels sind, die in der Kernvakuole in kristallinischer Form gefällt werden und unter geeigneten Bedingungen besonders bei Anwesenheit der nötigen Fermente wieder in Lösung gehen können. Bei Alectorolophus und dem Grundgewebe von Albuca sind sie typische Reservestoffe; die Kristalloide der Epidermis von Albuca u. a. gehen erst in alternden oder degenerierenden Zellen in Lösung, die der Knospenschuppen von Fraxinus sind Exkrete.

Eine Vorprüfung auf Eiweißkristalle ist nach A. Meyer[5]) die folgende: Man wirft dünne Schnitte in absoluten Alkohol, läßt sie 12 Stunden darin und legt sie dann 3—6 Stunden in Ponceaulösung (1 g Ponceau 6 R, 100 ccm Wasser, 20 Tropfen Essigsäure) oder in eine 0,2proz. wässerige Lösung von Säurefuchsin. Man wäscht die Schnitte in absolutem Alkohol und untersucht sie in diesem oder in Wasser. Eiweißkristalle sind relativ stark gefärbt und lösen sich in 2proz. Kalilauge.

Zum Nachweis von Eiweißkristalloiden in Pinguicula grandiflora ging Pujiula[6]) folgendermaßen vor: 1. Fixierung in einer weingeistigen

---

[1]) A. Zimmermann, Über die Proteinkristalloide, Beitr. z. Morph. u. Phys. d. Pflanzenzelle, 1890, Heft I, S. 54, Heft II, S. 112.

[2]) Doch beobachtete A. Meyer (Analyse der Zellen S. 84), daß Eiweißkristalle der Cladodien von Phyllocactus phyllantoides Link durch eine Hülle gegen Auflösung geschützt werden.

[3]) Stock, Zur Kenntnis der Proteinkristalle, Tübinger Diss., Breslau 1892.

[4]) R. F. Solla, Über Eiweißkristalloide in den Zellkernen von Albuca, Österr. bot. Zeitschr., 1920, LXIX, S. 110.

[5]) A. Meyer, Morphologische und physiologische Analyse der Zelle usw., S. 62.

[6]) J. P. R. Pujiula, Nuevos datos sobre cristaloides intranucleares en Pinguicula grandiflora, Ref. in Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1917, XXXIV, S. 126.

Sublimatlösung nach Zimmermann oder in einer Mischung von gleichen Teilen von absolutem Alkohol und einer gesättigten wässerigen Sublimatlösung[1]). Dauer der Fixierung bei Schnitten durch frisches Material aus freier Hand 4—6 Stunden, für Einbettung in Paraffin oder Zelloidin und Mikrotomschnitte 24 Stunden. 2. Einlegen in jodhaltigen 70proz. Weingeist, bis sich dieser nicht mehr entfärbt. Bei Einschluß in Paraffin oder Zelloidin steigender Weingeist. 3. ½ Stunde in destilliertes Wasser. 4. 24 Stunden in 0,2proz. wässerige Lösung von Säurefuchsin. 5. Auswaschen in Wasser, bis nur noch die Kristalle gefärbt sind. 6. Einschluß in Glyzeringelatine, Kanadabalsam oder Damarlack.

Über die Färbung von Eiweißkristalloiden mit Hollborns „Multikolor-Solution" s. J. Kisser, Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., 1926 (1927), XLIII, S. 502.

Eiweißkristalloide im Zellkern[2])

In den Zellkernen sind Eiweißkristalloide nicht selten. Radlkofer Lit. S. 798, 6) beschreibt sie bei Lathraea, Vogl (Lit. S. 237, 2)[3]), der sie mit Cochenille färbt, bei Campanula trachelium (Fig. 162a). Sie kommen vor in den Zellkernen von Pinguicula, Galtonia, Utricularia[4]), Stylidium, Pirola[5]), Hyacynthus, Convolvulus; Campanula-Arten, Mimulus (Samenknospe), Candollea adnata (Palisaden), Alectorolophus major (Fruchtwand, Fig. 162b), Melampyrum arvense (Schwammparenchym, Fig. 162c), Lophospermum scandens (Epidermis), Polypodium ireoides u. a. (Lit. S. 799, 1), Ornithogalum caudatum (Fruchtknotenwand)[6]), Clandestina (Tracheidenkopf)[7]), Chlorophytum comosum, Agapanthus umbellatus, Allium porrum, Albuca, Scilla u. a.[8]). Sie kommen schon in nächster Nähe der Vegetationspunkte und in jugendlichen Keim-

[1]) Eine weitere Variation ist die Mischung von Schaudinn: 2 Teile 7proz. Sublimatlösung (warm), 1 Teil absoluten Alkohol.

[2]) Vgl. dazu die Liste in Georg Tischler, Allgem. Pflanzenkaryologie (Linsbauers Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. II, Berlin 1921, S. 88.

[3]) Vogl hebt die Löslichkeit in Wasser bei nachfolgendem Alkoholzusatz hervor und sagt: „Bei Zusatz von Äther und Alkohol entstehen später sehr kleine, spießige Kristalle". Der Befund sollte nachgeprüft werden.

[4]) J. Klein, Die Zellkernkristalloide von Pinguicula und Utricularia, Jahrb. f. wiss. Bot., 1882, XIII, S. 60.

[5]) Raunkjär, Bot. Zentralbl., 1887, XXX, S. 236.

[6]) E. Straßburger, Bot. Prakt., 1897, Pens. IV.

[7]) E. Heinricher, Lit. S. 94, 1 u.: Vorkommen von Eiweißkristallen bei Lathraea, Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, XXXV, S. 28.

[8]) R. F. Solla, Über Eiweißkristalloide in den Zellkernen von Albuca Österr. bot. Zeitschr., 1920, LXIX, S. 110.

pflanzen vor. In den Zellkernen der Algen scheinen Eiweißkristalloide zu fehlen.

Die Kristalloide treten in der Ein- und Mehrzahl in den Kernen auf, sind rundlich, tafel-, stäbchen- und nadelförmig. Letztere sind zuweilen verbogen. Die Kristalloide können unregelmäßig gekrümmt, ihre Kanten abgerundet sein. Sie sind sehr empfindliche Gebilde und schon Vogl 1867 und dann Leitgeb[1]) wiesen darauf hin, daß sie durch den Säuregehalt des Zellsaftes rasch zerstört werden und sich meist in sehr verdünnter Essigsäure auflösen. An stärkeren Stellen der Präparate (in unverletzten Zellen) sind sie bei lebendem Material in den meisten Fällen ohne weiteres gut sichtbar und heben sich auch von den Nukleolen durch ihre Größe und Gestalt genügend scharf ab. Nur wenn sie sehr klein sind und rundliche Form besitzen, so daß sie mit Nukleolen verwechselt werden können, oder zu Dauerpräparaten wird man zur Fixierung und Färbung greifen. Als Fixierungsmittel hat sich konzentrierte weingeistige Sublimatlösung bewährt (Kutikula einschneiden!) sowie Merkels Flüssigkeit. Gefärbt wird nach Zimmermann[2]) mit 0,2proz. wässeriger Lösung von Fuchsin. Diese Lösung, die bis in die neueste Zeit überwiegend benutzt[3]) wird und durch Zusatz von etwas Kampfer haltbar gemacht werden kann, färbt in 12—24 Stunden. Die Präparate werden sofort in fließendem Wasser ausgewaschen, die Färbung, die sich nur auf die Kristalloide beschränkt, hält sich in Kanadabalsam. Man kann auch Mikrotomschnitte mit konzentrierter Säurefuchsinlösung erwärmen und zum Auswaschen warme konzentrierte wässerige Kaliumdichromatlösung benutzen. Gute Färbungen geben ferner Fuchsin-Jodgrün, Fuchsin-Pikrinsäure, Hämatoxylin u. a. Huie[4]) gebraucht zum Fixieren die Mannsche

Fig. 162. Kristalloide in Zellkernen: *a*) Campanula trachelium (Wurzel), *b*) Alectorolophus adnata (Fruchtwand), *c*) Melampyrum arvense (Blatt) (*b* nach Zimmermann)

[1]) H. Leitgeb, Proteinkr. i. Zellk., Graz. Mitt., 1886, I, 115.

[2]) A. Zimmermann, Üb. d. tinktionelle Verhalten der Zellkernkristalloide, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1893, X, S. 211.

[3]) A. Mrazek, Über geformte eiweißartige Inhaltskörper bei den Leguminosen, Österr. bot. Zeitschr., 1910, LX, S. 198.

[4]) L. Huie, On some protein crystalloids and their probable relation to the nutrition of the pollentube, La Cellule, 1895, XI, S. 1.

Lösung (Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1894, XI, S. 479: 12 g Sublimat, 0,75 g Chlornatrium in 100 g Wasser, 1 g Pikrinsäure, 1 g Tannin) und färbte 24 Stunden mit einem Gemisch von 35 ccm 1proz. wässerigem Methylenblau und 45 ccm 1proz. wässerigem Eosin. Dann folgt Umschwenken in Wasser, Entwässern mit Weingeist und Übertragung bis zur Rotbraunfärbung in ein Gemisch von 30 ccm Weingeist und 4 Tropfen 1proz. weingeistiger Natronlauge; ferner Entfernen der Natronlauge mit Weingeist, 1 Minute in Wasser, 2 Minuten in mit Essigsäure angesäuertem Wasser, Entwässern, Xylol, Kanadabalsam. Heinricher fixiert die sehr hinfälligen Kristalloide in Clandestina mit siedendem Weingeist und färbt mit Böhmers Haematoxylin (schwarzviolett), Gentianaviolett (blau) oder Fuchsin (rot). Doppelfärbungen führte Zimmermann mit Säurefuchsin und Delafieldschem Hämatoxylin aus (Kristalloide rot, Kerngerüst blau). Die gleiche Färbung bewährte sich nach Sperlich[1]) bei Alectorolophus. Ein Beweis für die Eiweißnatur eines Kristalls liegt in den Färbungen nicht, er muß durch die spezifischen Eiweißreaktionen (s. S. 664) erbracht werden.

Eiweißkristalloide in Chromatophoren

Die Eiweißkristalloide sind meist langgestreckte Prismen, fein ausgezogene Nadeln, würfel- und oktaederförmig. Ecken und Kanten sind oft undeutlich ausgebildet. Größere Kristalloide treten, das Stroma stark zurückdrängend, in der Einzahl, kleinere zu mehreren auf.

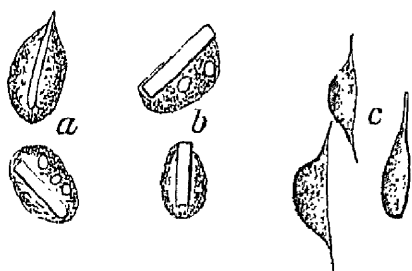



Fig. 163. Kristalloide in Chromatophoren a) Exogonium purga (Kelch), b) Hedera helix (Blattstiel), c) Psychotria emetica (Wurzel). (c nach Hartwich)

In lebendem Material werden die meisten Kristalloide in Wasserpräparaten ziemlich schnell zerstört. Zuweilen sind sie in Waser unlöslich (Canna). Sie heben sich oft nur wenig vom gefärbten Chromatophor ab. Man beobachtet in 4proz. Rohrzuckerlösung, oder fixiert und färbt mit weingeistiger Sublimatlösung und Säurefuchsin-Kaliumdichromat (Zimmermann, s. auch S. 801); das Stroma bleibt farblos, die Kristalloide treten rot gefärbt hervor. In Weingeistmaterial sind sie gehärtet und leichter auffindbar (der Farbstoff ist entfernt), in Drogen findet man sie selten. In den Chromatophoren der Blätter und Stengel sind sie oft anzutreffen (Pellionia, Convolvulus tric., Hedera spec., Vanilla, Canna, Drimys u. a., Fig. 163), hier und da in Knollen (Phajus grandif.), selten in

[1]) A. Sperlich, Die Zellkernkristalloide von Alectorolophus, Bot. Zentralbl., Beih., 1906, XXI, S. 1.

Wurzeln. In der Wurzel von Psychotria emetica[1]) (Kork, äußeres Rindenparenchym) sind lang ausgezogene nadelförmige Kristalloide (Fig. 163c). Vielleicht zählen die spindelförmigen Gebilde von Eiweißcharakter im Rindenparenchym von Nepenthes melamph.[2]) und der Balsaminen ebenfalls hierher.

Guignard schilderte die Entstehung von Eiweißkristallen in den Plastiden der Pollenkörner von Asclepiadaceen (Cr. Acad. sciences, 1922, CLXXV).

Leukosomen nennt Zimmermann sehr kleine kuglige Einschlüsse der Leukoplasten (in der Einzahl oder zu mehreren auftretend), die sehr empfindlich sind, von Wasser gelöst, von Kaliumdichromat zerstört werden, mit 0,2proz. Säurefuchsin bei mit konzentriertem weingeistigem Sublimat fixiertem Material Tradescantia, Tangentialschnitte der Blätter) färbbar sind und ihren Reaktionen nach (Jodwasser, Xanthoproteinreaktion, Millons Reagens) den Eiweißstoffen nahestehen. Ähnliche Gebilde fand Arthur Meyer[3]) in den Leukoplasten der Epidermiszellen des Laubblattes von Tradescantia discolor.

Eiweißkristalloide im Cytoplasma

Die im Cytoplasma und im Zellsaft vorkommenden Eiweißkristalloide sind von verschiedener Form: würfelförmig (Kartoffel)[4]), oktaederartig (Polypodium ireoides, untere Blattepidermis), wetzsteinförmig (Vanda furva, Passiflora-Arten), spindel- bis gedreht nadelförmig (Gratiola off., Fruchtknotenwand, Scilla, Griffel [hier werden sie vom wachsenden Pollenschlauch aufgebraucht, Huie, Lit. S. 801,4]), ringförmig (Epiphyllum, Zweige)[5]). Kristalloide finden sich in Oncidium micr. (Blatt)[6]), Leguminosen (Blüten)[7]), Euphorbia splend. (Parenchym)[8]), Abies (Rinde)[9]), Capsicum (Frucht- und Scheidewand, Lit.

[1]) C. Hartwich, Boliv. Drog., Schw. Wchschr. Chem. Pharmaz., 1909, XLVII, Nr. 10.

[2]) E. Heinricher, Biol. v. Nepenth., Ann. Buitenz., 1906, V, 227.

[3]) A. Meyer, Morphologische und physiologische Analyse der Zellen usw., S. 112.

[4]) Von F. Cohn (37. Jahrb. schles. Ges. vaterl. Kult., Breslau, 1860) aufgefunden, der die Quellungsfähigkeit der Kristalloide betonte und darauf hinwies, daß ihre Löslichkeit von der Lokalisation abhängt. Die nahe dem Kork gelagerten Kristalloide sind am schwersten löslich.

[5]) H. Molisch, Merkw. Proteink. in Zweig. v. Epiphyll., Ber. bot. Ges., 1885, III, 195 u.: Chiemlewsky, Bemerk. hierzu, Bot. Centralbl., 1887.

[6]) K. Mikosch, Vork. geformt. Eiweißes, Ber. bot. Ges., 1890, VIII, 33.

[7]) Baccarini, Bot. Centralbl., 1896, LXV, 391.

[8]) Frey, Ann. of. Bot., 1891, V, 413.

[9]) F. v. Höhnel, Sitzgsb. Wien. Ak., 1881, $LXXXIV_1$, 589.

S. 257, 1). In großer Menge kommen sie im Stamm wurzelfauler Kartoffelpflanzen vor[1]).

Im Milchsaft von Musa finden sich in den Vakuolen Kristalloide, die in Wasser, Äther, Weingeist, Chloroform unlöslich sind, in 1proz. Mineralsäuren und in 1proz. Essigsäure etwas aufquellen, sich aber leicht in konzentrierten Säuren und in verdünnter Kalilauge und Ammoniak lösen (Lit. S. 264, 2). Sie färben sich bei gewöhnlicher Temperatur mit wässerigem Gentianaviolett-Methylenblau, mit Böhmers Haematoxylin, beim Erwärmen mit Methylgrün-Essigsäure und mit Säurefuchsin. Sie geben die Xanthoprotein-Reaktion und enthalten Gerbstoff (mit Ferrosulfat, Blaufärbung). Wasserzutritt zu frischem Milchsaft macht die Vakuolen sichtbar und durch Quellung auch die kleinen Proteinkörner im Milchsafte zahlreicher anderer Pflanzen (Lit. S. 194, 2). Zahlreiche Eiweißkristalle kommen im Milchsaft von Mangifera indica vor (Molisch).

Ungemein kleine Plasma-Eiweißkristalle hat Heinricher in Lathraea aufgefunden (quadratische und rhombische Plättchen von 1 μ Seitenlänge). Diese lassen sich mit Sicherheit nur dann identifizieren, wenn gleichzeitig Zellkernkristalloide im Präparate zugegen sind und übereinstimmende Reaktionen erhalten werden. Doch kommen bei Lathraea auch große Kristalle im Plasma vor (Blumenkrone). In den Blättern von Phytolacca abyssinica fand Kruch[2]) im subepidermalen Gewebe Kristalloide, die sich in 10—20proz. Chlornatrium- und Kaliumnitratlösung, Glyzerin, verdünnter Kalilauge, verdünnter Essig- und Salzsäure lösen, aber unlöslich in Wasser und in 5proz. Zuckerlösung sind und im übrigen Eiweißreaktionen geben.

An dieser Stelle seien die spindel- und nadelförmigen Körper angeführt, die in den Epidermiszellen von Drosera dichotoma und Dionaea meist in Einzahl auftreten, nach Reizung der Blätter sich abrunden und in mehrere Teile zerfallen, nach starker Reizung kleiner werden, von Gardiner als Reservestoffe angesprochen und Plastoiden (Rhabdoiden) genannt wurden[3]). Sie lassen sich durch Weingeist, 1proz. Chromsäure und Pikrinsäure fixieren, nehmen durch Jodjodkalium sphäritische Gestalt an und verquellen in verdünntem Weingeist bis zum Verschwinden.

[1]) E. Heinricher, Ber. deutsch. bot. Ges., 1891, IX, 287.

[2]) O. Kruch, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1896, XIII, S. 390.

[3]) W. Gardiner, On the Phenomena accompanying Stimulation of the Gland-Cells in the Tentacles of Drosera dichotoma. Proc. roy. Soc. London, V, XXXIX, S. 229. — Rhabdoiden nannte Wakker fadenförmige Kristalloide im Knollen von Tecophilea cyanoc., die mit Millon und Salpetersäure nicht reagieren (Ein neuer Inhaltsk. d. Pflanzenzelle, Jahrb. wiss. Bot., 1891, XXIII, 1).

Eigenartige durchsichtige Eiweißkristalloide wurden von Noll[1]) in den Siphoneen Derbesia und Bryopsis aufgefunden. Es sind Sphärokristalle und fasrige, aus kleinen Nadeln bestehende Gebilde, die sich vorgebildet im Zellsaft finden, in der lebenden Zelle aber wenig deutlich hervortreten. Ihr schwaches Lichtbrechungsvermögen deutet auf einen hohen Wassergehalt hin. Sie werden aber sichtbar, wenn man das Deckglas gelinde drückt. Beim Zerreißen des Thallus werden sie herausgeschleudert, verkleben hierbei zum Teil untereinander und unterstützen derart den Wundverschluß[2]). Sie sind am reichlichsten bei gut ernährten Algen vorhanden (Reservestoffe). Sie färben sich mit Jodjodkalium, werden, nach vorausgegangener Beizung mit wässeriger Tanninlösung und Auswaschen, mit 1proz. Osmiumsäure braun[3]) und speichern Cochenille (rotbraun), Methylenblau, Safranin, Neutralrot, Kongorot, Eosin, Nigrosin, Thionin. Die Färbung ist verschieden, die strahlig radialen Kugeln werden mit Eosin gelbrot, die Fasergebilde dunkelrot (Noll)[4]). Sie sind widerstandsfähig gegen Süßwasser, Glyzerin, Salzsäure, Kalilauge, zerfallen beim Kochen in Glyzerin bei 290°, lösen sich in heißer Schwefelsäure, werden durch Weingeist trübe und undurchsichtig.

Schließlich sind hier die Eiweißspindeln zu erwähnen, die Molisch (Pflanzenbiologie in Japan, S. 242) neben anderen Eiweißkristallen in Vaucheria-Arten fand.

Pyrenoide

Pyrenoide (Fr. Schmitz, Jahrb. wiss. Bot., 1884, XV, 1), Stärkeherde, stark lichtbrechende verschieden geformte Einschlüsse der Chromatophoren vieler Algen, bei Anthoceros und im Protonema einiger Laubmoose, bestehen aus einem proteinhaltigen Kern, der von einer hyalinen Zone, der Stärkehülle (bei Euglena von Paramylon) umgeben ist. Sie treten in lebenden Zellen nicht immer gut hervor, besser in fixiertem Material (oft genügt Eintauchen in kochendes Wasser). Der Eiweißkern ist teils nicht kristallinisch, teils (von Czurda bezweifelt) kristallinisch (Cladophora, Bryopsis, Schimper (Lit. S. 790, 4), Prasiola, Lagerheim (Ber. bot. Ges., 1892, X, 366), Haematococcus, Wollenweber (Festschr. bot. Ges., 1908, XXV, 238). Die Pyrenoide entstehen durch Teilung (Zimmermann [Lit. S. 166, 2], Klebahn [Jahrb. wiss. Bot., XXII, 415]), wahrscheinlich sind sie schon in den Leukoplasten angelegt (Zumstein, Lit. S. 776). Bei Volvox u. Gonium gibt Overton (Bot. Centralbl., 1889, XXXIX, 148) Neubildung an.

Die Stärkeabscheidung erfolgt an der Oberfläche des Pyrenoids, aber auch in dessen Innern. Die Pyrenoidstärke verhält sich gegenüber Reagentien, wie die Stärke der höheren Pflanzen.

Die üblichen Fixierungsmittel verändern die Pyrenoidsubstanz und die Gestalt des Pyrenoids (Czurda).

Das denaturierte Pyrenoid speichert ungefähr ebenso Farbstoffe wie der Nucleolus des Zellkerns.

[1]) F. Noll, Exper. Unters. üb. d. Wachstum d. Zellmembr., Habilitationsschr. u. Abh. Senckenb. Ges., 1887, XV, 101.

[2]) E. Küster, Derbesia u. Bryopsis, Ber. bot. Ges., 1899, XVII, 77.

[3]) A. Ernst, Zellinh. v. Derbesia, Flora, 1904, XCIII, 514.

[4]) F. Noll, Geformte Prot. v. Derbesia, Ber. bot. Ges., 1899, XVII, 302.

Der zentrale Teil des Pyrenoids gibt alle Eiweißreaktionen.

Die Pyrenoide der Chromatophoren von Anthoceros sind typische Eiweißstoffe, die die Xanthoprotein- und Millon-Reaktion, vereinzelt auch die Biuret-Reaktion geben. Sie lösen sich nicht in Kochsalz- oder Sodalösung. Färbung am besten mit Biondi-Ehrlich-Heidenhains Dreifarbenlösung (Grübler, Scherrer).

Über die Verbreitung von Pyrenoiden s. Czurda, V., Morphologie und Physiologie des Algenstärkekorns, Beihefte z. bot. Centralbl., XLV, H. 2, S. 129, 1928; vgl. auch Bock, F., Zur Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Pyrenoide, Arch. f. Protistenkunde, 1926, LVI, S. 128.

Nach Geitler[1]) sind die Pyrenoide weder lebende Gebilde noch einfaches Reserveeiweiß, nach Czurda sind sie lebende Zellorganellen.

Steinecke u. Ziegenspeck[2]) betrachten auf Grund der Veränderungen, die sie an verdunkelten und wieder belichteten Pyrenoiden beobachteten, das Pyrenoid als „den Speicher für Fermente in einer Prophase". Bei der Stärkebildung werden vermutlich aus den Vorstufen die eigentlichen stärkebildenden „Fermente" erzeugt.

Der Proteinkern der Pyrenoide quillt mit Lauge und wird durch Pepsinsalzsäure verdaut, die mit Weingeist denaturierten Pyrenoide lösen sich in Eisessig.

Von der Stärkehülle hebt sich die Pyrenoidmembran in doppelter Kontur scharf ab. Die Membran ist widerstandsfähig gegen Millons Reagenz, während die Chromatophoren mehr oder weniger zerstört werden. Millons Reagens benutzt man somit zur Sichtbarmachung der Pyrenoide (auch die sog. Pyrenoidbänder [Spirogyra, Mougeotia] sind gegen Millon widerstandsfähig). Meist wird jedoch fixiert und gefärbt: Fixierung mit konzentriertem Sublimatalkohol, Auswaschen, 24stündige Färbung in 2proz. Säurefuchsin, Auswaschen in Wasser (10—20 Minuten), Entwässern, Kanadabalsam (Pyrenoide rot). Chmielewski (Strasburgers Prakt.) fixiert mit 10proz. rotem Blutlaugensalz + Essigsäure und färbt mit Hofmanns Violett.

Als Fixierungsmittel empfiehlt Geitler[3]) Sublimatalkohol nach Schaudinn und Flemmingsche Lösung, zur Färbung Heidenhains Eisenalaunhämatoxylin, wenn es sich nur um das „distinkte" Hervortreten der Pyrenoide handelt. Beim Studium des Baues zusammengesetzter Pyrenoide erhält man die klarsten Bilder mit Altmanns Säurefuchsin-Methode.

[1]) L. Geitler, Zur Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Pyrenoide, Arch. f. Protistenkunde, 1926, LVI, S. 128.

[2]) Fr. Steinecke u. H. Ziegenspeck, Veränderungen im Pyrenoid während der Stärkeproduktion, Ber. deutsch. bot. Ges., 1928, XLVI, S. 678.

[3]) L. Geitler, Zur Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Pyrenoide, Arch. f. Protistenkunde, 1926, LVI, S. 128.

Brand[1]) wendet zum Nachweis der Pyrenoide Chlorzinkjod an. Zimmermann (Mikrot., S. 202) benutzt Pikrinsäure-Säurefuchsin. Auf ein Uhrgläschen mit konzentrierter Lösung von Pikrinsäure in 50proz. Weingeist kommen 5 Tropfen konzentrierte Säurefuchsinlösung (Einwirkung einige Stunden, Auswaschen mit Weingeist 10—20 Minuten, Einschließen in Kanadabalsam). Mit Nigrosin-Pikrinsäure bleibt die Haut farblos, die Kristalloide werden blau. Boubier[2]) färbt mit 2—5proz. Kongorot und 0,5proz. Chrysoidin und bringt die Präparate auf einen Augenblick in Millons Reagens; Chromatophoren, Kristalloide nebst Pyrenoidmembran werden blau. — Außerdem behandelt er Algenmaterial nacheinander mit Jodwasser, Wasser, Sublimatalkohol, Alkohol und Chloralhydrat und färbt mit einer Lösung von Säurefuchsin in Chloralhydrat; hierbei hebt sich die Membran ab und färbt sich nur schwach, während Zellkerne und Kristalloide rot werden.

Diatomeenpyrenoide, die nach Mereschkowsky[3]) farblos sein dürften, lassen sich mit Rubin-Orange-Methylgrüngemisch färben (Mitrophanow)[4]), Euglenenpyrenoide mit Rubin S und Coccinin (Dangeard)[5]). Bei letzteren erhält man gute Bilder bei Behandlung der Präparate auf dem Objektträger mit Säurefuchsin, verdünnter Pikrinsäure und verdünntem Glyzerin. Verdünntes wässeriges Gentianaviolett benutzte Schmitz.

Klebs fand Pyrenoide in jungen Pflanzen von Botrydium, was Korshikov[6]) bestätigt; letzterer fand sie noch in Bumilleria, indem er mit Schaudinns Flüssigkeit fixierte und mit Alaun-Hämatoxylin färbte. Bei Botrydium fixierte er mit Carnoys oder Bouins Flüssigkeit und färbte mit Säurefuchsin. Um Aplanosporen und Zoosporen gleichzeitig zu fixieren und zu färben verwendet er eine etwa 5proz. wässerige Lösung von Säurefuchsin, die etwa 10 % Natriumsulfat und ein wenig Formalin enthält. Die Pyrenoide färben sich rot, während die Chromatophoren noch einige Zeit ihre normale Farbe behalten. Ehe man die Gegenstände in Kanadabalsam bringt, kann man sie noch in eine Lösung von Viktoriablau in Nelkenöl legen, wodurch die Chromatophoren bläulich werden.

Die Pyrenoide der Phaeophyceen entsprechen nach Kylin[7]) nicht den Pyre-

[1]) F. Brand, Analyse der aerophilen Grünalgenanflüge, Arch. f. Protistenkunde, 1925, LII, S. 265.

[2]) A. M. Boubier, Contr. á l'ét. du pyrenoide, Bull. de l'Herb. Boissier, 1899, VII, S. 451.

[3]) C. Mereschkowsky, Über farblose Pyrenoide und gefärbte Eläoplasten der Diatomeen, Flora, 1903, XCII, S. 77.

[4]) P. Mitrophanow, Beob. üb. Diatom., Flora, 1898, LXXXV, 293.

[5]) P. A. Dangeard, Rech. s. Eugl., Le Bot., 1902, VIII, 97.

[6]) A. A. Korshikov, Beihefte z. bot. Centralbl., 1930, XLVI, S. 470.

[7]) H. Kylin, Über die Fuconsanblasen der Phaeophyceen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1918, XXXVI, S. 10.

noiden der anderen Algen. Sie werden von Jod oder Vanillin-Salzsäure nicht gefärbt, von Osmiumsäure nicht geschwärzt und speichern weder Methylenblau noch Methylviolett.

Abweichungen gegenüber den Pyrenoiden der Chlorophyceen zeigen auch die analogen Gebilde der Bangiaceen. Näheres darüber s. bei Czurda l. c.

Zur Färbung der kinoplasmatischen Verbindungsfäden von Pyrenoid und Zellkern leistet bei Chlorophyceen eine sehr verdünnte Lösung von Jodwasser-Eosin gute Dienste (v. Derschau, Stärke blau, Zellkerne, Pyrenoide und Verbindungsfäden rosenrot). Auch Eisenhämatoxylin läßt sich benutzen.

Characeenkörper

Characeenkörper, Stachelkugeln, Wimperkörper, sind kleine Gebilde, die vornehmlich an fixiertem Material (Nitella) neben den Zellkernen scharf hervortreten; sie sollen (Overton)[1]) aus kristallinischen Eiweißsubstanzen bestehen und oft auch Gerbstoff führen (Jodjodkalium braun, 10% Rohrzucker + Schwefelsäure rot, Molybdänschwefelsäure bläulich). Sie färben sich nach Fixieren mit Sublimatalkohol mit Boraxcarmin und Fuchsin. Die kristallinische Struktur (s. aber unten) tritt am besten an mit Boraxcarmin gefärbten und in Tolubalsam eingebetteten Objekten hervor. Für ihren Gerbstoffgehalt sprechen die Reaktionen mit Osmiumsäure (hellbraun), Ferrichlorid (schwärzlich), 10proz. Kaliumdichromat (braunrot) und Lebendfärbung mit Methylenblau. In Eisessig, Salzsäure, Salpetersäure, konzentrierter Schwefelsäure bleiben sie fast unverändert und nehmen beim Kochen mit Natronlauge unter Lösung ihrer Stachelhülle eine schwammige Struktur an. — Die sog. nackten Stachelkugeln sind wasserhelle Blasen. Sie kommen bei einigen Characeen (Ch. fragilis, hispida) ausschließlich vor, während bei anderen Übergänge zwischen stachligen und nackten Formen auftreten. In ihren Reaktionen stimmen sie mit den Stachelkugeln überein und sind nach Votava deren Anfangsstadium. Nach demselben Autor besitzen die Stachelkugeln keine kristallinische Struktur und geben keine Gerbstoffreaktionen, wohl aber die des Eiweiß.

Aleuronkörner

Die Aleuronkörner wurden von Th. Hartig (Bot. Ztg., 1855, XIII, 881) entdeckt. v. Holle, der die Kristalloide 1858 mit Ammoniak auszog und die zurückbleibenden Globoide in verdünnter Essigsäure löste, sowie Maschke (Bot. Ztg., 1859, XVII, 409), der aus Bertholletia eine kristallinische Substanz gewann, arbeiteten überwiegend makrochemisch. Trécul (Ann. scienc. nat., 1858, X, 20)

[1]) E. Overton, Beiträge zur Histologie und Physiologie der Characeen, Bot. Centralbl., 1890, XLIV, S. 1.

und Sachs (Bot. Ztg., 1862, X, 242) schrieben noch den Aleuronkörnern einen Fettgehalt zu. Unsere Kenntnis wurde am meisten gefördert durch die klassische Arbeit Pfeffers (Lit. S. 193, 1). Tschirch zog die Körner zur Diagnose heran und klärte die morphologischen Verhältnisse auf. Mit der chemischen Erforschung der in den Körnern enthaltenen Eiweißstoffe beschäftigten sich Vines, Osborne u. a.

An einem Aleuronkorn unterscheidet man 1. die Gesamthaut, 2. die Grundmasse und 3. die Einschlüsse. Die Einschlüsse sind entweder a) Kristalloide, b) Globoide, c) Kristalle. Diese Einschlüsse vertreten sich meist gegenseitig und können sogar ganz fehlen (Papilionaceen, Lupinus, Pisum, Phaseolus). Anderseits kann die Grundmasse fast rudimentär werden (Myristica). Die Körner ein und derselben Pflanze können verschiedene Einschlüsse besitzen, so daß einige Körner nur Kristalloide führen, andere nur Globoide (Theobroma)

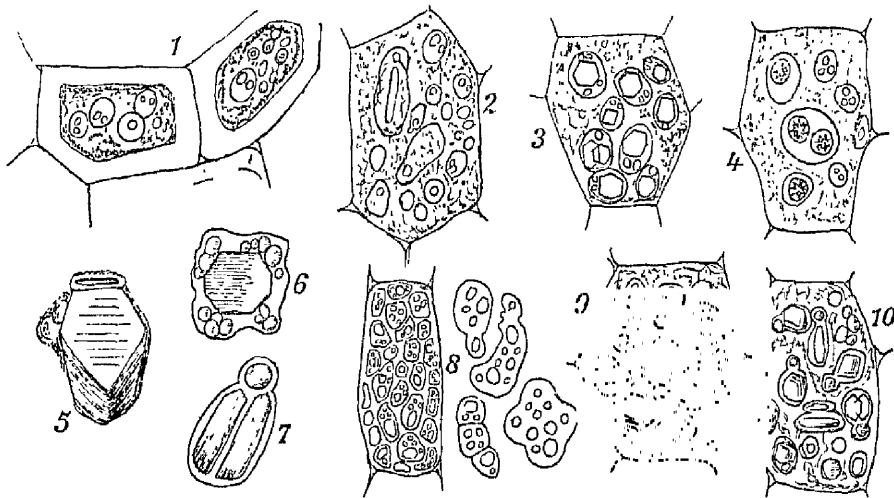



Fig. 164. Aleuronkörner von: Strychnos nux vomica *1*, Prunus amygdalus var. amar. *2*, Ricinus com. *3*, Ferula uarthex *4*, Myristica surinamensis *5*, Bertholletia excelsa *6*, Linum usitatissimum *7*, Helianthus annuus *8*, Hyoscyamus niger *9*, Daphne mezereum *10*. Präparate in Sublimat-Alkohol, *8* in Osmiumsäure (Tunmann)

oder einige Körner nur Globoide, andere nur Kristalle (Pimpinella). Sehr häufig sind in einem Korne Globoide und Kristalloide (Papaver, Datura, Linum, Cannabis, Rizinus u. a.). Alle Einschlüsse können in der Ein- oder Mehrzahl zugegen sein. Die Größe der Körner schwankt von 1 bis 55—60 μ und wechselt je nach den Geweben und Gewebepartien. Die Körner der Randschichten des Endosperms sind oft kleiner als im inneren Endosperm (Hyoscyamus, Strychnos), im Embryo kleiner als im Endosperm (Datura). Die Mannigfaltigkeit im Aufbau der Aleuronkörner ist eine recht große (Fig. 164).

Die Aleuronkörner kommen ausschließlich im Samen vor (Endosperm, Perisperm, Embryo, für Pulveruntersuchungen diagnostisch wichtig!) und zwar vorzugsweise in ölreichen Samen, während sie im allgemeinen in stärkehaltigen Samen stark zurücktreten und auf gewisse Schichten beschränkt sind. Sie sind rundlich, eiförmig, polyedrisch, langgestreckt, gebogen, gelappt oder kristalloidartig. Zu-

weilen scheint Öl zu fehlen, Schellenberg[1]) konnte im Samen der Plantagoarten kein Öl ermitteln bei gleichzeitiger Anwesenheit von Eiweißkristallen und Globoiden. Beim Zentrifugieren angequollener oder angekeimter Samen sammeln sich die Aleuronkörner am zentrifugalen Ende der Zellen an, das Öl findet sich in den zentripetalen Zellenden (Andrews, Lit. S. 25, 1). Die Körner sind meist farblos bis hellgelb.

Bildung und Auflösung der Körner verfolgte zuerst eingehender Gris[2]). Sie entstehen im letzten Stadium der Reife des Samens aus eiweißreichen Vakuolen, wie (im Gegensatz zu Lüdtke[3]) Wakker zeigte (Lit. S. 183,3).

Über die Entwicklung der Aleuronkörner im Endosperm des Rizinussamens macht Guilliermond[4]) folgende Angaben:

Zunächst enthalten die Zellen eine oder mehrere große Vakuolen, die sich mit Neutralrot diffus färben, dagegen mit den Färbeverfahren für Mitochondrien (s. S. 769) farblos bleiben. In dem der Reifung der Samen unmittelbar vorhergehenden Stadium beladen sich diese Vakuolen mit Eiweißstoffen, verlieren Wasser und bilden eine Anzahl kleiner Vakuolen, in denen ein Kristalloid und ein oder mehrere Globuline auftreten. Diese Vakuolen färben sich stark mit Neutralrot, das außerdem einen Teil ihres Inhaltes als stark gefärbte und lebhafte Brownsche Bewegungen zeigende Körperchen ausfällt; Kristalloide und Globoide bleiben ungefärbt. Ähnliche Körperchen wie mit Neutralrot entstehen durch die Fixierungsmittel der Verfahren zum Nachweis der Mitochondrien; sie färben sich mit Eisenalaun. Die Globoide bleiben farblos, die Kristalloide färben sich intensiv schwarz. In einem späteren Stadium koaguliert das Eiweiß; die Vakuole geht dadurch in ein festes Körperchen über, das ein Kristalloid und mehrere Globoide enthält. In diesem Zustand färbt sich das Aleuronkorn nicht mehr mit Neutralrot, dagegen — mit Ausnahme der Globoide — vollständig mit den Färbeverfahren für Mitochondrien.

Bei der Keimung nehmen die Aleuronkörner Wasser auf, schwellen an und werden wieder zu kleinen Vakuolen, die sich — mit Ausnahme der Kristalloide und Globoide — mit Neutralrot diffus färben und außerdem stark gefärbte und Brownsche Bewegung zeigende Körperchen liefern. In einem späteren Stadium vereinigen sich die Vakuolen zu größeren, in denen sich Kristalloide und Globoide allmählich auflösen und zuletzt entsteht eine einzige von Kristalloiden und Globoiden freie, größere Vakuole, die sich mit Neutralrot unter gleichzeitiger Ausfällung von Körperchen färbt.

Mit den Mitochondrien-Verfahren bleiben die Vakuolen des ersten Keimungs-Stadiums farblos, enthalten aber zahlreiche gefärbte Körperchen; die Kristalloide

[1]) H. C. Schellenberg, Die Reservezellulose der Plantagineen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1904, XXII, S. 9.

[2]) Gris, Recherch. sur la germinat., Ann. d. scienc. nat., 1864, 5. sér., II, S. 98.

[3]) Fr. Lüdtke, Beitr. z. Kenntn. d. Aleuronkörner, Jahrb. wiss. Bot., 1889, XXI, 62.

[4]) A. Guilliermond, Le vacuome des cellules végétales, Protoplasma, 1930, IX, S. 133, insbesondere S. 157.

färben sich intensiv und nehmen, während sie sich auflösen, ein sehr verschiedenes Aussehen an. Die zuletzt entstehende große Vakuole zeigt unter diesen Umständen nur noch einige gefärbte Körperchen.

Peklo[1]) glaubt nachgewiesen zu haben, daß die Aleuronkörner in der Aleuronschicht der Gramineen Ausscheidungen von Pilzhyphen sind, eine Ansicht, der Arthur Meyer entgegentritt.

Nach Mottier sollen die Aleuronkörner aus kleinen Körnchen (Plastiden) hervorgehen.

Isolierte Aleuronkörner von Bertholletia gaben Netolitzky 13—15 % Asche mit 35—36 % P_2O_5, 8,5—9,5 % CaO und 17—19 % MgO; sie enthält außerdem Kalium, Natrium, Eisen, Aluminium und Schwefel. Kalium ist neben Phosphorsäure, Magnesium und Kalzium ein Bestandteile der Globoide.

Zum Studium wählt man dünnere Präparate. Ein Einlegen in Wasser ist am besten zu vermeiden, da durch das Wasser das Ölplasma zersetzt wird und die frei werdenden Öltröpfchen und Ölmassen einen Einblick in das Präparat erschweren. Überdies wird im Wasser die Grundmasse der Körner gelöst, so daß die Körner zerfallen. Für den Anfänger ist auch die Gefahr nicht ausgeschlossen, kleinere, Schleimbläschen enthaltende Öltröpfchen mit Aleuronkörnern zu verwechseln. Zur Feststellung der Gestalt und Größe der Aleuronkörner, der Lage der einzelnen Körner in der Zelle und zueinander und ihrer Anzahl trägt man seit Hartig die Schnitte (die Samen dürfen zuvor nicht längere Zeit gewässert haben) direkt in Öl oder in Glyzerin ein. Ferner kommen als Einbettungsmittel Terpentin[2]) und Anilin[3]) in Betracht, sowie absoluter Alkohol. Letzterer bietet den Übelstand, daß er schnell verdunstet und bald erneuert werden muß. Die Körner sind gut sichtbar, die Globoide erscheinen in den öligen Flüssigkeiten als kleine kuglige, hohl aussehende Gebilde, die Kristalloide sind nicht oder doch nur schwer sichtbar. Recht brauchbar ist eine konzentrierte Rohrzuckerlösung. Die Präparate werden aufgehellt, selbst in stärkeren Schnitten sind die Körner sehr gut zu erkennen, ein störender Einfluß des Öles tritt nicht ein, das Deckglas haftet fest an, so daß die Präparate für einige Zeit als Dauerpräparate (S. 106) aufbewahrt werden können. Die Globoide erscheinen als Hohlkugeln, die aus den angeschnittenen Zellen herausgefallenen Körner lassen nach einiger Zeit auch die Kristalloide scharf hervortreten. Hinsichtlich der Erhaltungsdauer in Zuckerlösung lassen sich die Körper in zwei Gruppen gliedern. Bei der einen (Amygdalus, Linum) sind sie in unangeschnittenen Zellen

[1]) J. Peklo, Über die Zusammensetzung der sogenannten Aleuronschicht, Ber. deutsch. bot. Ges., 1913, XXXI, S. 370.

[2]) A. L. Winton, Anat. d. Hanfs., Zeitschr. Nahr. -u. Genußm., 1904, VII, S. 385.

[3]) O. Tunmann, Anw. v. Jodzuckerlös., Apoth.-Ztg., 1912, XXVII, S. 261.

ungefähr zwei Monate lang gut erhalten, nach längerer Zeit erfolgt allmähliche Zersetzung. Bei der anderen Gruppe (Rizinus) bleiben sie noch nach sechs Monaten völlig intakt.

Um die Körner noch schärfer hervortreten zu lassen, vereint man geeignete Einbettungsmittel mit Jod. Eingebürgert hat sich Jodglyzerin, Jodparaffin und Jodzuckerlösung (Jod 0,1—0,2 g, Jodkalium 0,3—0,5 g, konzentrierte Zuckerlösung 10 g). Das Präparieren in letzterer ist selbst dem üblichen Beobachten nicht entfetteter Schnitte in Jod-Weingeist vorzuziehen. Bei dem Präparieren in Jod-Weingeist legt man die Präparate in Weingeist und fügt vorsichtig Jodjodkaliumlösung zu. Bei Zusatz von Jodjodkalium bläht sich die Gesamthaut auf, erscheint sackartig aufgedunsen, die sich gelb färbende Grundmasse löst, resp. zersetzt sich unter Quellung (infolge des Wassergehaltes der Reagens), die Kristalloide färben sich langsam gelb und treten gut hervor, während die Globoide ungefärbt bleiben. Am besten ist dieses Verfahren beim Rizinussamen angebracht. Je schwerer sich aber das im Plasma enthaltene Öl des betreffenden Samens in Weingeist löst, um so unklarer wird das Präparat, um so schwieriger die Beobachtung.

Sehen wir in den Öl- und Siruppräparaten die Gestalt der Körner und der Globoide, so benutzen wir zur besseren Sichtbarmachung der Kristalloide 1proz. Osmiumsäure. Die Ölmassen werden meist langsam braun, oft nach längerer Zeit schwarz, die Aleuronkörner bleiben, da sie kein Öl führen, zunächst farblos. Sehr scharf treten hierbei die Kristalloide hervor. Zerdrückt man ein zartes Präparat durch leichten Druck auf das Deckglas, so gelangen zahlreiche Aleuronkörner in den Untersuchungstropfen, und man sieht unschwer, daß mehr oder weniger eine Trennung in der Weise eintritt, daß sich die leichteren Fetttropfen und Ölmassen in den oberen Schichten ansammeln, während die spezifisch schweren Aleuronkörner in die tieferen Schichten des Untersuchungstropfens sinken. Bei oberer Einstellung der Mikrometerschraube bemerkt man vorzugsweise Öltropfen, bei tieferer Einstellung überwiegend die Aleuronkörner. Durch leichten Druck auf das Deckglas kommen die Aleuronkörner ins Rollen und können nun gut von allen Seiten beobachtet werden. Doch reagieren nicht alle Fette mit Osmiumsäure (S. 253), andererseits werden nach einiger Zeit auch die Aleuronkörner braun. Schneller wie Osmiumsäure wirkt Chromosmiumessigsäure. Auch andere Zellkern-, Fixierungs- und Färbungsmittel hat man als Beobachtungsmedien gebraucht; bewährt soll sich weingeistige Boraxkarminlösung haben (Rotfärbung).

Zu einer eingehenden mikrochemischen Untersuchung, vorzüglich zu vergleichenden Studien über die nähere Natur der Einzelbestandteile

der Aleuronkörner sind entfettete Schnitte unbedingt erforderlich. Das Entfetten richtet sich nach der chemischen Natur des Öles. Zuweilen genügt bereits eine kurze Mazeration (20—30 Minuten) in möglichst absolutem Alkohol (Rizinus), meist eine 1—2tägige Mazeration der Präparate in einem Fläschchen mit absolutem Alkohol unter Umschütteln. Sollte das Öl sich schwer in Alkohol lösen, dann folgt der Alkoholmazeration eine mehrstündige Nachbehandlung mit Alkoholäther. Dadurch wird die Grundsubstanz etwas gehärtet und erweist sich schwerer löslich in Reagentien. Stärkere Mittel (Sublimatalkohol) sind nicht zu benutzen, da sie zu stark in den Chemismus der Körner eingreifen. Zur Konservierung benutzte Gram[1]) Formalin, wodurch die Kristalloide resistent gegen Kalilauge werden.

Zur Untersuchung der Aleuronkörner benutzt Netolitzky[2]) eine Lösung von 1 Teil Ätzkali in 9 Teilen 96proz. Weingeist, die in der Kälte das Fett rasch, die Aleuronkörner nur sehr langsam angreift.

Die Gesamthaut, die Pfeffer zum Cytoplasma zählt, besitzt Eiweißcharakter. Sie schmiegt sich der Skulptur des Kornes dicht an, erscheint daher zuweilen grubig punktiert, worauf schon Hartig und Raffinesque[3]) hinwiesen; bei Wasserzutritt dehnt sie sich aus. In Alkohol-, Öl-, Glyzerin-, Anilinpräparaten ist sie nicht sichtbar. Um die Haut sichtbar zu machen, muß man an entfetteten Schnitten in geeigneter Weise die Grundmasse zuerst in Lösung bringen (Einlegen der Schnitte in Wasser). Fast stets ist die Gesamthaut unlöslich in Wasser (bei Amygdalus ist sie wasserlöslich, Kritzler). Gegen stark verdünnte Alkalien zeigt sie ein verschiedenes Verhalten.

Die Grundmasse ist farblos, bisweilen schwach gelblich, amorph, trübe, homogen oder schwach körnig und enthält neben Globulinen nach Kritzler[4]) kleine Mengen von Albumosen. Sie färbt sich mit Vanillinsalzsäure rotviolett. Diese Reaktion läßt sich bereits an nicht entfetteten Schnitten gut vornehmen, wenn man die Präparate direkt in die Lösung einträgt. Im allgemeinen ist die Grundsubstanz leicht löslich in Wasser. Bei Elaeis und Lupinus wird sie von Wasser nach Vines[5]) nicht gelöst. Verdünnte Alkalien lösen.

---

[1]) B. Gram, Über die Proteinkörner im Samen der Ölgewächse, Landw. Versuchsst., 1902, LVII, S. 257.

[2]) F. Netolitzky, Notizen über alkoholische Kalilauge als mikrochemisches Reagens für Stärke und Aleuron, Festschr. f. A. Tschirch (1926), S. 362.

[3]) M. G. Raffinesque, De l'enveloppe des grains d'Aleurone, Bull. Soc. Linnéenne de Paris, 1874.

[4]) H. Kritzler, Mikr. Unters. ü. d. Aleuronkörner, Diss. Bern, 1900, S. 74.

[5]) S. H. Vines, On the chemical composition of aleuron grains, Proc. Roy. Soc. London, 1879, XXVIII, S. 218.

Die höchstens 5 μ großen Globoide haben ihren Eiweißcharakter am meisten verloren und bestehen aus dem Kalzium- und Magnesiumsalz einer gepaarten Phosphorsäure mit organischem Paarling. Denn werden die Globoide im Schnitte mit konzentrierter Kalilauge behandelt, so bleibt (Pfeffer) ein Rest zurück, der sich mit „Jod oder Anilin" färbt, „also die Anwesenheit eines stickstoffhaltigen, vermutlich proteinhaltigen Stoffes zu erkennen" gibt[1]). Sie kommen von den Einschlüssen am häufigsten vor, sind zwar nicht in allen Körnern anzutreffen, wohl aber in den meisten Samen (nach Pfeffer in allen Samen). Die Globoide sind kugelig, eiförmig, biskuitförmig, seltener unregelmäßig gelappt oder traubenförmig und isotrop.

Die Globoide sind unlöslich in sehr schwacher Kalilauge und Ammoniak, löslich in sehr verdünnten anorganischen und organischen Säuren (Essigsäure, Weinsäure), in gesättigter Lösung von Kochsalz, Monokaliumphosphat, Ammonsulfat, Ammonphosphat und in mit Schwefelsäure angesäuertem absolutem Alkohol. Mit einer ammoniakalischen Lösung von Ammonchlorid und Ammonphosphat bilden sie Kriställchen von Ammonium-Magnesiumphosphat. In fetten Ölen, Anilin, Kanadabalsam, konzentrierter Rohrzuckerlösung erscheinen sie als Hohlkugeln, da sie das Licht schwächer als jene Flüssigkeiten brechen. Die Betrachtung eines Wasserpräparates zeigt aber schon, daß die Globoide körperliche Bildungen sind. Über den Volutinnachweis S. 679. An Beziehungen des Volutins zu den Globoiden dachte Guilliermond[2]).

Die Kristalloide sind eiweißartiger Natur, heben sich in Öl-, Alkohol-, Glyzerin-, Anilinpräparaten nicht von der Grundmasse ab, da Grundmasse und Kristalloide das Licht annähernd gleich stark brechen. Schon Radlkofer (S. 798, 6) wies auf die Ähnlichkeit der Kristalloide (Rizinus, Bertholletia, Sparganium) mit dem „Hämatokristallin und den Dotterplättchen" hin. Ihre physikalischen Eigenschaften wurden sehr ausführlich von Naegeli[3]) studiert, der die Bezeichnung Kristalloid einführte, die Quellungsfähigkeit betonte und

[1]) Plahl hält die nach Behandlung der Aleuronkörner mit 20proz. Kalilauge bleibenden Gebilde für Magnesiumhydroxyd. W. Plahl, Zu Pfeffers Angaben über das Verhalten der Globoide zu konzentriertem Alkali, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1923, XL, S. 31.

[2]) Guilliermond, Rech. cytolog. s. l. germination d. graines d. quelq. graminées et contribut. á l'étude des graines d'aleurone, Arch. d'anat. micr., 1908, X; Chifflot et Kimpflin (A propos des globoides des graines d'aleurone, Ass. fr. p. l'avanc. d. sc., Congr. d. Reims, 1907) verneinen derartige Beziehungen.

[3]) C. Naegeli, Über die aus Proteinsubstanzen bestehenden Kristalloide in der Paranuß, Sitzgsb. Münch. Akad., 1862, II, 120, Bot. Mitt., 1862, I, 217.

zeigte, daß sie mit einer Membran umgeben sind (übrigens sind die Globoide ebenfalls mit einem zarten Häutchen umgeben). Schimper[1]) brachte uns aber den Beweis, daß ein solch tiefgreifender Unterschied zwischen Kristall und Kristalloid, wie ihn Naegeli annahm, nicht besteht. In kristallographischer Hinsicht sind bei den Kristalloiden nur „die Winkel etwas schwankend; die optischen Eigenschaften stimmen mit denjenigen echter Kristalle überein". Die Kristalle gehören dem regulären und hexagonalen System an. Regulär und tetraedrisch-hemiedrisch sind sie bei Rizinus, Euphorbia, Linum, Viola, Passiflora, Ruta, Menispermum canadense, hexagonal-rhomboedrisch-hemiedrisch bei Bertholletia, Myristica, Elaeis, Cocos, Taxus, Pinus, Sparganium, Solanaceen, Papaveraceen, Campanulaceen u. a. Die Kleinheit der Kristalloide und die Unbeständigkeit in der Ausbildung erschwert die genaue Kristallbestimmung sehr. Jedenfalls sind sie isotrop oder schwach doppelbrechend. Die beste Doppelbrechung zeigen die Kristalloide des hexagonalen Systems. Nach vorausgegangener Fixierung können sie gefärbt werden (siehe weiter unten). Nach mikrochemischen Untersuchungen bestehen sie aus mindestens zwei Globulinen von verschiedener Löslichkeit in 1—10proz. Neutrallösungen.

Die Löslichkeitsverhältnisse weisen Abweichungen auf. Nach Kritzler soll die Keimfähigkeit der Samen von der Löslichkeit der Kristalloide und letztere wiederum von dem Alter der Samen abhängig sein. Auf diese Weise soll sich die Keimfähigkeit der Samen ermitteln lassen. Nach Tunmann (Lit. S. 671, 3) vermag wohl hohes Alter der Samen die Löslichkeit der Kristalloide (und der Grundmasse) zu vermindern (Rizinus), doch lassen sich keine Schlüsse auf die Keimfähigkeit ziehen; die Keimung findet nur langsamer statt. Lakon[2]) fand bei Fraxinus Beziehungen zwischen Keimfähigkeit und dem in den Aleuronkörnern enthaltenen Mucin.

Die Kristalle bestehen, wie es scheint, immer aus Kalziumoxalat. Oft kommen Drusen vor, die einen proteinhaltigen Kern führen, dann Tafeln, seltener Hendyoeder. Ihr Nachweis ist leicht zu führen. Die Oxalatkristalle sind teils in der Grundmasse eingebettet, teils wie bei vielen Umbelliferen in den Globoiden. Nach Wittlin[3]) sind die Kristalle von keiner besonderen Haut umgeben. Löst man bei Myristica surinamensis (entfettete Schnitte) die Grundsubstanz mit Wasser, die

[1]) A. F. W. Schimper, Unters. üb. d. Proteinkristall. d. Pflanz., Diss. Straßburg, 1878 u.: Üb. d. Kristallis. d. eiweißart. Substanz., Zeitschr. f. Krist. u. Min., 1881, V, 131.

[2]) G. Lakon, Anat. u. Keimungsphys. d. Eschensamen, Zeitschr. Forst- u. Landw., 1911, IX, 285.

[3]) J. Wittlin, Üb. d. Bild. d. Oxalattaschen mit bes. Berücksicht. off. Pfl., Berner Diss., 1896, S. 24, Bot. Zentralbl., 1896, LXVII.

Kristalloide mit verdünntem Kali, die zurückbleibenden Globoide mit stark verdünnter Essigsäure, dann bleiben die Oxalattafeln zurück, die sich in sehr verdünnter Salzsäure restlos auflösen. Vorher hatte aber Lüdtke (l. c. S. 810, 3) eine Kristallmembran angegeben, die nach Herauslösen der Grundsubstanz mit verdünnter Kalilauge bei Einwirkung einer gesättigten Lösung von Natriumphosphat hervortreten sollte. Der Nachweis gelingt an entfetteten und mit Pikrinsäure fixierten Schnitten, die direkt in 0,5proz. Salzsäure eingelegt werden. Auf diese Weise wird eine Strömung vermieden. Zur Beobachtung ist polarisiertes Licht und möglichst starke Vergrößerung unbedingt erforderlich (Tunmann).

Das reaktionelle Verhalten der einzelnen Bestandteile der Aleuronkörner und die benutzten Reagentien sind in der Tabelle, S. 818, zusammengestellt. Es empfiehlt, sich den entfetteten Schnitt zunächst auf dem Objektträger eintrocknen zu lassen und das Reagens erst dem trockenen Präparate zuzufügen. Es kommt hier auf die Konzentration der Reagentien an und der Gehalt derselben wird bei Einwirkung auf in Wasser liegende Präparate verändert. Die Wirkung des Reagens verfolge man unter dem Mikroskop. Das Verdunsten des Reagens wird durch einen Wachsrand verhindert. Zur Kontrolle werden die Präparate gleichzeitig in größeren Quantitäten des gleichen Reagens mazeriert. Doch ist nicht zu vergessen, daß die Körner und ihre einzelnen Einschlüsse durch den zur Entfettung benutzten Alkohol oder Äther ziemlich weitgehende Änderungen in ihrem reaktionellen Verhalten erleiden (Vines[1]), 1880). Es ist somit vorteilhaft, die Schnitte nicht zu lange in dem Entfettungsmedium zu belassen und die Entfettung dadurch zu beschleunigen, daß man die Schnitte in einem Fläschchen mit Alkohol oder Äther schüttelt. Es sei nochmals betont, daß sowohl Gesamthaut und Grundmasse als auch Globoide und Kristalloide bei den Körnern verschiedener Pflanzen eine verschiedene Zusammensetzung besitzen. Überdies hat Rendle[2]) gezeigt, daß die jugendlichen Aleuronkörner (Lupinus digitatus) sich anders zu Kochsalz, Salzsäure (1—10 %) und phosphorsaurem Kali (10 %) verhalten als die Körner der reifen Samen. Demnach werden die Reaktionen auch durch das Entwicklungsstadium der Samen beeinflußt. Daß die Dauer der Aufbewahrung (das Alter) von Einfluß ist, war S. 815 erwähnt.

Die mikrochemischen Reaktionen verlangen somit eine kritische Beurteilung nach jeder Hinsicht. Sie müssen nicht nur die Entfettungs-

---

[1]) S. H. Vines, On the chemical composition of the aleuron grains, Proc. of the Royal Soc. of London, 1880, XXX, S. 387.

[2]) A. B. Rendle, On the development of the aleurone grains in the Lupin, Ann. of Bot., 1888, II, S. 161.

methoden, sondern auch das Entwicklungsstadium und das Alter der Samen berücksichtigen. Jedenfalls sind verschiedene Literaturdifferenzen auf nicht genügende Berücksichtigung dieser Verhältnisse zurückzuführen. Zum Teil liegen aber Beobachtungsfehler vor. Bei den kleinen Gebilden ist die Entscheidung keineswegs leicht, ob sich die Grundmasse oder das Globoid gelöst hat oder nicht. Hier wird man entweder zu gefärbten Lösungen greifen oder größeres Gewicht auf die Feststellung des durch die Lösung veränderten Brechungsexponenten legen müssen. Auf absolute Reinheit der Reagentien ist großes Gewicht zu legen.

Färbungen dienen bei den Aleuronkörnern nur zu Demonstrationspräparaten. Zuerst wurde Tannin benutzt (Overton, Lit. S. 808, 1). Dünne Schnitte werden mit absolutem Alkohol entfettet, auf 10 Minuten in eine verdünnte Tanninlösung gebracht, mit Wasser gut ausgewaschen und mit 1proz. Osmiumsäure behandelt; sie lassen sich nach dem Auswaschen in Glyzerin einschließen (Eiweißkristalle gelbbraun). Poulsen[1]) entfettet mit absolutem Alkohol, legt in eine 25proz. Tanninlösung (1 Stunde) und wäscht mit Wasser aus. Nun gelangen die Schnitte entweder in wässeriges Kaliumdichromat bis zur Braunfärbung und werden in Glyzerin eingebettet oder sie werden auf ½ bis 1 Stunde in 10—20proz. Ferrosulfat bis zur tiefblauen Färbung gebracht, mit Alkohol entwässert, dann folgt Nelkenöl, Kanadabalsam.

Nach Krasser[2]) gelangen die Schnitte auf einige Stunden in eine alkoholische Pikrinsäure, die mit Eosin im Überschuß versetzt ist, werden mit Alkohol differenziert, mit Nelkenöl aufgehellt, in Kanadabalsam eingeschlossen (Grundsubstanz dunkelrot, Kristalloide gelb, Globoide farblos bis rötlich). Statt Eosin kann Nigrosin benutzt werden (Grundsubstanz blau, Kristalloide gelbgrün, Globoide farblos). — Gute Dauerpräparate gibt Säurefuchsin und die Methode von Strasburger-Chmielewsky (Prakt., 1897, S. 99), welche die Reaktion von Axenfeld[3]) benutzt (mit der noch Eiweiß 1 : 2 000 000 nachgewiesen werden kann). Die entfetteten Schnitte gelangen auf mehrere Stunden vor Licht geschützt in eine alkoholische Goldchloridlösung (1 Tropfen 10proz. Goldchloridlösung auf 20 Tropfen absoluten Alkohol) und verweilen dann ebenso lange bei Belichtung in Ameisensäure (5—10 Teile Ameisensäure in 100 Teilen 50proz. Weingeist). Die Eiweißkristalle sind

---

[1]) V. A. Poulsen, Note sur la préparation des grains d'aleuron, Rev. gén. d. Bot., 1890, S. 547.

[2]) Fr. Krasser, Über neue Methoden zur dauerhaften Präparation des Aleuron und seiner Einschlüsse, Sitzgsb. zool.-bot. Ges. Wien, 1891, XLI, S. 42.

[3]) Axenfeld, S. une nouv. réact. de l'albumine, Journ. Pharm. d'Anvers, 1886, S. 317.

Tabelle der mikrochemischen Reaktionen auf Aleuronkörner

Gesamthaut	Grundmasse	Globoide	Kristalloide	Kristalle
		Löslich in		
Kalkwasser (s. schwer) verd. Kalilauge[1]) (schwer) verd. ((1 %) Säuren[1]) „ 1% Chlorammon[2]) 1% Magnesiumsulfat konz. „	Wasser, meist leicht oder doch unter Quellung sich zersetzend[3]) verd. Ammoniak „ Kalilauge (1 %) „ Essigs. (1 %) „ Salzs. (bis 3 %) „ u. konz. Kochsalz „ „ „ Magnesiumsulf. konz. Natriumphosphat[4]) „ Dinatriumphosph. Kalkwasser	organ. Säuren (Essigsäure, Weinsäure u. a.) verd. u. konz. Salzsäure konz. u. verd. Kochsalz „ „ „ Chlorammon „ Ammonsulfat „ Kaliummonophosphat konz. Natriumphosphat[4]) „ Dinatriumphosphat (nach längerer Zeit) 20 % Borax-Weinstein konz., mit Essigsäure anges. Kochsalz	verd. Kalilauge Kalkwasser (langsam) konz. Natriumphosphat „ u. verd. Chlorammon „ Kochsalz „ Essigs. (sehr schwer) 20% Magnesiumsulf. (meist.) 3 % Salzsäure 1 % Essigsäure	Salzs. ohne Gasentwicklung konz. Kalilauge (sehr schwer)
		Unlöslich in		
Wasser (nur quellend) konz. Dinatriumphosphat konz. Ammoniumphosphat	20 % Borax-Weinstein (zum größten Teil) konz. Ammonsulfat „ , mit Essigsäure anges. Kochsalz	kalt. u. kochend. Wasser Kalkwasser verd. Kalilauge (meist.)	kalt. Wasser quillt, kochend. Wasser koaguliert konz. Dinatriumphosph. „ Kaliummonophosph. „ Ammonsulfat konz., m. Essigs. anges. Kochs.	Wasser verd. u. konz. Essigsäure verd. Kalilauge
Jodjodkal. schwach gelbl.	Jodjodkalium gelblich Vanillinsalzsäure rotviolett	Jodjodkalium farblos Isol. Globoide a. Magnes. u. Phosph. gepr.	Jodjodkalium gelbbraun Vanillinsalzsäure violett	konz. Schwefels. Gipsnadeln

[1]) Nach Pfeffer unlöslich. — [2]) Es sind stets wässerige Lösungen gemeint. — [3]) Durch mehrtägige Mazeration mit Alkohol oder Äther (zur Entfettung), ebenso durch alkoholische Sublimatlösung (2 %) und durch Pikrinsäure wird die Grundmasse gehärtet und körnig gefällt und ist dann schwerer löslich, besonders in Wasser, Magnesiumsulfat und Chlornatrium. — [4]) Diese Angabe von Lüdtke konnte Gram nicht bestätigen.

rosenrot bis violett. Die Schnitte kommen in verdünntes, dann allmählich in konzentriertes Glyzerin und werden in Glyzeringelatine eingeschlossen. — Andrews (Lit. 25, 1) fixiert Samenstücke mit Chromosmiumessigsäure; ausgewaschen wird mit Wasser, entwässert mit Alkohol; dann folgt Chloroform, Paraffin, Herstellung von Mikrotomschnitten, Färbung dieser mit Safranin-Gentianaviolett-Orange und Einschließen in Balsam.

Aleuronkörner lassen sich nach Gertz nach vorhergehender Fixierung durch Pikrinsäure oder 40proz. Formol auch mit einer schwefelsauren Anthocyanlösung (s. S. 756) färben. Bei Triticum vulgare, Zea Mays, Pisum sativum, Vicia Faba, Lupinus albus, Cucurbita pepo tritt die Färbung fast unmittelbar ein, bei Ricinus communis und Bertholletia excelsa sind 12—24 Stunden nötig.

Zum Nachweis von Aleuronzellen in Mehlen benützen Berliner und Rüter[1]) das käufliche kolloide Eisenhydroxyd, das um die Bestandteile der Aleuronzellen rasch ringförmige Niederschlagszonen bildet.

Fig. 165. Triticum (Querschnitt der Randschicht des Samens), einschlußfreie Aleuronkörner (a) in der Kleberschicht (Tunmann)

Die in den Kleberschichten enthaltenen kleinen (1—3 μ) Proteinkörner von Triticum sollen nach O'Brien[2]) aus einer, aus koagulierten Proteinstoffen bestehenden, Membran und aus einem homogenen Kern bestehen, der die Natur der Globoide und der Grundmasse vereint (Fig. 165). Wasser, 1—10proz. Chlornatrium, 50proz. Weingeist, Gerbsäure, Osmiumsäure, Pikrinsäure lösen den Kern, aber nicht die Membran. Ammoniumchlorid, Dinatriumphosphat, Natrium- und Ammoniumkarbonat, Kalkwasser, Essigsäure, Mineralsäuren lösen Kern und Membran. 1proz. Kalilauge löst den Kern, die Membran bleibt selbst nach 5tägiger Einwirkung ungelöst. Durch längere Behandlung mit absolutem Alkohol (2 Monate) wird der Kern unlöslich in Wasser und Chlornatrium. Bei Secale führen die Körner 1—4 Globoide, die in Essigsäure löslich sind (Haberlandt, Lit. S. 684, 3).

Stärke

Die Stärke ist das erste sichtbare Produkt der Kohlensäureassimilation, sie zählt zu den wichtigsten Bau- und Reservestoffen. In den Assimilationsorganen

[1]) E. Berliner u. R. Rüter, Mehlmikroskopie V, Über einige mikroskopische Beobachtungen an den Aleuronzellen des Getreidekorns, Zeitschr. f. d. ges. Mühlenwesen, 1930, VI, S. 160; Ref. in Zeitschr. f. wiss. Mikrosk., 1930, XLVII, S. 131.

[2]) M. O'Brien, The proteids of wheat, Ann. of Bot., 1895, IX, S. 172.

finden wir in den Chlorophyllkörnern (S. 766) kleine Stärkeeinschlüsse, Assimilationsstärke. In größerer Menge wird sie in den Reservestoffbehältern gespeichert, Reservestärke.

Stärkekörner fehlen den Pilzen, den Cyanophyceen, Diatomeen und Phäophyceen. Bei Flechten bildet sich in und an den Gonidien ein Kohlenhydrat, das von Tobler[1]) als Stärke angesprochen wird. Im Winter und im Dunkeln verschwinden vorzugsweise die außerhalb der Gonidien befindlichen, den Hyphen anliegenden Körnchen.

In einigen wenigen Fällen entsteht Stärke außerhalb von Plastiden, so bei Pocillomonas flos aquae, Polytoma uvella, Rhodochytrium u. a. Die Regel ist, daß die Stärkekörner in und an Chromatophoren entstehen und zwar so lange das Stroma funktionsfähig ist (Boehm, A. Meyer, H. Winkler u. a.). Sie bleiben dann meist von der (zuweilen allerdings sehr feinen) Masse der Chromatophoren eingeschlossen.

Maige[2]) schließt aus Beobachtungen beim Ergrünen der Plastiden, daß das Stroma — sicher bei Kartoffel und Erbse und wahrscheinlich auch noch in vielen anderen Fällen — das ganze Stärkekorn umgibt.

Dasselbe ergibt sich aus Beobachtungen über die Einwirkung der Amylose.

Die in farblosen Organen sich bildende Stärke kann nach Guilliermond[3]) auf zweierlei Weise entstehen. In einer großen Zahl von Wurzeln (Ricinus u. a.) bildet sie sich in Mitochondrien, die die Rolle von Amyloplasten spielen, in anderen dagegen (Phajus grandifolius, Ficaria ranunculoides) in wirklichen Amyloplasten.

Derselbe Forscher[4]) hat mit dem Verfahren von Champy-Kull beobachtet, daß in der Rizinuswurzel das Stärkekorn unmittelbar nach seiner Entstehung inmitten des rotgefärbten Chondriokonten blau erscheint und sich dadurch deutlich von dem orange gefärbten Cytoplasma abhebt.

Wir unterscheiden einfache Körner (in einem Chromatophor entsteht nur ein Korn), zusammengesetzte Körner (an verschiedenen Stellen eines Chromatophors entstehen Körner, die sich bei weiterem Wachstum gegenseitig berühren); halbzusammengesetzte Körner sind zusammengesetzte Körner, die von gemeinsamen, die Teilkörner umgebenden Stärkeschichten umschlossen werden. Form und Größe der fast stets farblosen Körner sind diagnostisch wichtig und lassen sich mit Sicherheit oft nur an isoliert liegenden Körnern ermitteln. Größe 1—150 μ, selten größer. Zur Bestimmung der Gestalt werden die Körner isoliert,

---

[1]) F. Tobler, Vorkommen und Abbau von Flechtenstärke (Vorl. Mitt.), Ber. deutsch. bot. Ges., 1923, XLI, S. 406.

[2]) A. Maige, Rémarques au sujet de la persistance de l'écorce plastidale autour des grains d'amidon, Compt. rend. soc. biol. 1926, XCV, S. 299. Observations sur la digestion de l'amidon dans les cellules cotylédonaires de diverses légumineuses, ebenda, XCIV, S. 697.

[3]) A. Guilliermond, Recherches cytologiques sur le mode de formation de l'amidon usw., Arch. anat. micr., 1912—1913, XIV, S. 309.

[4]) A. Guilliermond, Sur une méthode permettant de colorer dans la cellule végétale les grains d'amidon au sein des mitochondries, Compt. rend. soc. biol., 1916, LXXIX, S. 806.

dann klopft man mit der Nadel auf das Deckglas eines Wasserpräparates, wodurch die Körner ins Rollen kommen, oder man läßt zu einem Wasserpräparat etwas Weingeist zutreten, wodurch Strömungen erzeugt werden. Überwiegend sind die Körner rundlich, oft durch gegenseitigen Druck abgeplattet, seltener flach scheibenförmig oder knochen- oder hantelförmig (Euphorbiaceen, Nerium Oleander und Allamanda Schottii). Doch kann es bei kleinen Stärkekörnern, die in völlig rundlichen Plastiden eingeschlossen sind, zur Ausbildung ellipsoidischer Formen kommen. *Das absolute Gewicht der einzelnen Stärkekörner ist bei den verschiedenen* Stärkearten naturgemäß recht verschieden. Ein typisches Stärkekorn wiegt bei Oryza sativa 0,(X)[1]18, Zea 0,(IX)82, Maranta arundinacea 0,(VIII)73, Triticum vulgare 0,(X)69, Solanum tuberosum 0,(VIII)75, Canna edulis 0,(VII)36 g. Diese Werte ermittelten Hartwich und Wichmann (Lit. S. 93, 1) mit der Zählkammer; die spezifischen Gewichte schwankten von 1,4696 (Triticum sativum) bis 1,5255 (Canna edulis).

Die Stärkekörner sind Sphärokristalle, die durch Apposition wachsen (F. Mirbel 1815, J. Fritzsche 1834, A. Meyer 1895, u. a.) und sich aus zahlreichen, sehr dünnen langgestreckten, nadelförmigen, radial angeordneten Kristallen, Trichiten, aufbauen. Sie kontrahieren sich bei Wasserentzug, quellen bei Wasserzufuhr, lagern Glyzerin ein und nehmen in ihren feinen Poren Farbstofflösungen auf, verhalten sich also wie die Sphärokristalle des Inulins, von denen sie sich aber durch ihre auf dem Amylosegehalt beruhende Lösungsquellung unterscheiden. Für den kristallinischen Aufbau der Stärkekörner spricht übrigens ihre Doppelbrechung im polarisierten Lichte. Bei gekreuzten Nicols zeigt jedes Stärkekorn, auch jedes Teilkorn eines zusammengesetzten Stärkekornes, ein schwarzes Kreuz, wenn der Durchmesser der Stärkekörner 4 μ überschreitet. Da die Arme des Kreuzes sich im Kern schneiden, so dient das polarisierte Licht in Zweifelfällen zur Ermittelung des Kernes.

C. Naegeli (Stärkekörner, Zürich 1858, abgedruckt in Ostwalds Klassiker der exakten Wissenschaften Nr. 227) nahm an, daß die kleinsten Teilchen der Stärkekörner mit einer Wasserhülle umgebene Atomkomplexe (Micellen) wären. Diese sollten auseinanderweichen und zwischen ihnen neue Micellen entstehen. Das Wachstum sollte auf Intussuszeption beruhen. Bei ultramikroskopischer Betrachtung bestehen die Stärkekörner (Weizen, Kartoffel) aus konzentrischen oder exzentrischen Reihen von Micellen, zwischen denen sich optisch leere Reihen befinden. Der Kern scheint optisch leer zu sein. Die Micellarreihen sind am besten an der Peripherie der Körner zu sehen. Die Stärkemicelle[2]) sind doppelbrechend (Gaidukov).

[1]) Die eingeklammerten römischen Zahlen zeigen die Anzahl der Nullen hinter dem Komma an.

[2]) Nach Staudinger sollte der Ausdruck Micellen nur solchen Kolloidteilchen zustehen, die elektrische Ladung tragen z. B. den in einer Seifenlösung vorhandenen Teilchen.

Die Naegelische Micellartheorie wurde endgültig bewiesen durch die Arbeiten von Ambronn und Herzog u. Janke. Ambronn stellte fest, daß sich die Stärke der Doppelbrechung durch Durchtränkung nicht ändert.

Nach Staudinger sind die Micellen Naegelis Krystallite, in denen die langen Moleküle durch Gitterkräfte zusammengehalten werden.

Aus den röntgenspektroskopischen Arbeiten von Herzog u. Janke geht hervor, daß den Stärkekornmicellen von Reis-, Mais- und Weizenstärke ein dreiachsiges Ellipsoid entsprechend dem rhombischen System mit dem Achsenverhältnis 0,7252 : 1 : 0,5509 zukommt.

Über eine vorläufige Einteilung der Stärkearten nach den Röntgen-Spektren s. I. R. Katz u. Th. B. van Itallie, Ztschr. physik. Chem., Abt. A, 1930, CL, S. 90.

Die einzelnen Lamellen der Stärke sind möglicherweise wie bei der Zellulose durch dünnste Fremdhautschichten voneinander getrennt (Hess u. Smith)[1]).

Nach Malfitano u. Catoire[2]) besteht das Micell aus einer endlichen Zahl von komplexen Molekülen im Sinne von Werner. Bei der Stärke sollen um ein Phosphat- oder Silikation $C_6H_{10}O_5$-Moleküle angeordnet sein, die ihrerseits Polymere von Polymeren sind. Das komplexe Ion sei nach außen durch H-Ionen, Alkali- oder Erdalkaliionen kompensiert.

Die mineralfreien organischen Polymeren, die aus der Stärke extrahiert werden können, seien Bestandteile der Komplexe von Komplexen, die Amylophosphate oder Amylosilikate sind.

Nach Samec[3]) kann die Malfitano-Catoiresche Komplextheorie nur für einen kleinen Bruchteil des Phosphors und der Kationen Geltung haben, während für das Gros des Phosphors die Estertheorie am besten den Tatsachen entspricht.

Sponsler[4]) kommt auf Grund einer Röntgenstrahl-Untersuchung zu folgendem Ergebnis. Im Stärkekorn sind die Atome regelmäßig und einheitlich angeordnet; die Regelmäßigkeit wird dadurch zerstört, daß man die Stärkekörner zerquetscht, woraus folge, daß sie nicht diejenige einer kristallinischen Struktur ist.

Zerriebene Kartoffelstärke verhält sich gegenüber Röntgenstrahlen wie ein amorpher Stoff.

Das organische Grund- oder Elementarmolekül der Stärke ist ein Kohlenhydrat $C_6H_{10}O_5$ oder ein Polymeres davon, das durch Hydrolyse mit Säuren als Endprodukt Glykose liefert; es ist also ein Anhydroderivat der Glykose oder eines

---

[1]) K. Hess u. F. A. Smith, Zur Kenntnis der Kartoffel-Stärke, Ber. deutsch. chem. Ges., 1929, LXII, S. 1619.

[2]) G. Malfitano u. M. Catoire, Zum Micellarzustand der Stärke, Kolloidzeitschr., 1928, XLVI, S. 3; auch Compt. rend. Acad. sciences, 1913, CXXVI, S. 1681; CXLIII, S. 400.

[3]) M. Samec, Die Micellartheorie der Stärke in ihren heutigen Formen und das physicochemische Verhalten der Stärkesubstanzen, Biochem. Zeitschr., 1930, CCXVIII, S. 249.

[4]) O. L. Sponsler, The structure of the starch grain, Amer. Journ. of Botany, 1922, IX, S. 471.

sich davon ableitenden höheren Saccharids. Manches spricht dafür, daß in der Stärke ein Di-glykohexosan (Diamylose) vorkommt, so das Auftreten von Maltose $C_{12}H_{22}O_{11}$ bei der enzymatischen Hydrolyse der Stärke und die Bildung von Maltobionsäure durch Oxydation von Stärke durch Baryumhypobromit (Hönig u. Ruzicka)[1]. Man hat berechnet, daß die Verknüpfung der Glykosereste in der Amylose durchgängig dieselbe ist, wie die Bindung der beiden Glykosereste in der Maltose[2].

Außer diesem organischen Stoff sind aber noch andere Stoffe am Aufbau der. Stärkemicelle beteiligt. Für die Beteiligung des Wassers (Malfitano) spricht die Tatsache, daß Stärke, besonders mit Säuren vorgewaschene, bei scharfem Austrocknen löslich wird und reichlich durch Kolloidmembranen hindurchgeht. Ferner hat sich gezeigt, daß nur wasserhaltige Stärke bei der Untersuchung mit Röntgen-Strahlen eine gittermäßige Anordnung erkennen läßt, während völlig entwässerte Stärke nur ganz verschwommene Ringe zeigt. Stärke enthält Kristallwasser[2])

Stärke, Zellulose und Inulin besitzen Kettenstruktur[3]).

Außerdem finden sich in der Stärke anorganische Anionen und Kationen, sowie N-haltige Verbindungen. 100 g einer bei 105° getrockneten Kartoffelstärke ergaben in einem Versuch von Samec folgende Aschenzusammensetzung:

SiO_2	P_2O_5	SO_3	CaO	MgO	Na_2O	K_2O
0,090	0,140	0,009	0,0395	0,024	0,018	0,019

Samec fand bei seiner Untersuchung über die Verteilung des Phosphors auf die beiden bei der Verkleisterung von Kartoffelstärke entstehenden Anteile (Lösung = Amylosen, Gel = Amylopektin) nach 24stündigen Erhitzen auf 58° (Quellungstemperatur), Trennen der beiden Phasen und erschöpfender Dialyse im Sol 0,045 %, im Gel 0,147 % P_2O_5. Das Sol eines bei 80° bereiteten 1proz. Kleisters aus Weizenstärke erwies sich nach weitgehender Elektrodialyse als phosphorsäurefrei. Auch J. Field (Proc. of the soc. for exper. biol. and med., 1928, XXV, S. 711) fand, daß ein Teil der Stärke des Stärkekorns phosphorfrei ist[4]).

Ein von Z. Gružewska durch Behandlung mit Lauge aus Kartoffelstärke erhaltenes Amylopektin enthielt 0,185 % P_2O_5.

Northrop u. Nelson konnten durch Behandlung von Stärke mit 10proz. Salzsäure ein Produkt mit 5,24—5,56 % Phosphor isolieren, in welchem ein P-Atom auf etwa drei $C_6H_{10}O_5$ kam (Journ. Amer. chem. soc., 1916, XXXVIII, S. 472.)

[1]) M. Hönig u. W. Ruzicka, Über den oxydativen Abbau der Stärke mit Brom in alkalischer Lösung, Biochem. Zeitschr., 1930, CCXVIII, S. 397.

[2]) K. H. Meyer, H. Hopff u. H. Mark, Ein Beitrag zur Konstitution der Stärke, Ber. deutsch. chem. Ges., 1929, LXII, S. 1103.

[3]) K. Freudenberg u. Mitarbeiter, Ber. deutsch. chem. Ges., 1930, LXIII, S. 1510.

[4]) Nach Kavčič (Kolloidchem. Beihefte, 1930, XXX, S. 406) tritt jedes Grammatom P mit um so mehr Gewichtsteilen Polysaccharid in Reaktion, je größer das Stärkekorn ist, da das Wachstum des Korn sich auf Kosten der P-freien Substanz vollzieht.

H. K. Berrenscheen u. W. Albers fanden in keimenden Roggen- und Weizensamen eine Oktaamylose-Phosphorsäure (Biochem. Zeitschr., 1928, CIIIC, S. 261.

Über die Verseifungszahlen verschiedener Stärkearten s. L. Rosenthaler, Pharmaz. Zentralhalle, 1925, XLVI, S. 631.

Nach W. Naegeli[1]) besteht die Stärkesubstanz überwiegend aus Granulose, welche mit Jod reagiert, und aus Stärkezellulose, die als zartes Skelett bei der Einwirkung von Speichel oder verdünnten Säuren zurückbleibt. A. Meyer[2]) bezeichnet die eigentliche Stärkesubstanz als Amylose, der geringe Mengen Amylodextrin beigemengt sind. Die Amylose besteht hauptsächlich aus γ-Amylose (Granulose Naegelis), die bei 100⁰ mit Wasser flüssig wird und der geringe Mengen α-Amylose beigemengt sind, die sich nicht mit Wasser bei 100⁰ verflüssigen läßt. Über das Verhalten dieser Stoffe gegen Jod s. S. 835. Nach Maquenne[3]) besteht die Stärke aus 80—85 % Amylose und aus 15—20 % verschieden kondensierten Amylopektinen. Beim Behandeln der Stärke mit kochendem Wasser löst sich die Amylose, während die Amylopektine nur aufquellen; sie sind es, die die Stärke schleimig und teilweise unlöslich in Alkali machen. Die Hülle der Körner der Kartoffelstärke besteht nach Gružewska (Compt. rend., 1911, CLII, 785) aus Mineralsubstanz und Amylopektin, der Kern enthält Amylose.

Amylose ist, wenn durch Dialyse gereinigt, aschenfrei pulverig. Ihre heiße wässerige Lösung — beim Abkühlen fällt sie wieder aus — ist dünnflüssig und kein Kleister. Mit Jod blau. Amylose (nach Pringsheim dargestellt) ist amorph, Amylopektin kristallinisch.

Amylopektin ist gummiartig, enthält Phosphorsäure auch im dialysierten Zustand und bildet Kleister. Mit Jod violett.

Biedermann[4]) findet in Weizenstärke — nicht in Kartoffelstärke — nach Entfernung von Amylose und Amylopektin — etwa durch Speichel — noch Amylozellulose (mit Jod farblos, mit Jod-Schwefelsäure oder Chlorzinkjod blau).

Völlig entschieden ist die Frage nach der Zusammensetzung der Stärke und ihrer von den verschiedenen Forschern angegebenen Bestandteile nicht. Vermerkt sei die Ansicht von Samec[5]), wonach Amylopektin sowohl aus der sich mit Jod bläuenden, als aus der sich mit Jod „rötenden" Komponente durch Paarung (Veresterung) mit Phosphat gebildet wird und daß ein Teil der organischen Substanz der Stärkekörner nicht mit Phosphorsäure in Beziehung steht.

Malfitano u. Catoire[6]) bezeichnen als Amylose die höchsten mit J noch

---

[1]) W. Naegeli, Beitr. z. näheren Kenntn. d. Stärkegruppe, 1874.

[2]) A. Meyer, Untersuchungen über die Stärkekörner. Wesen und Lebensgeschichte der Stärkekörner der höheren Pflanzen, Jena 1895.

[3]) L. Maquenne, Über die Stärke und ihre diastatische Verzuckerung, Bull. Soc. Chim. d. Paris 1906, XXXV, S. 1.

[4]) W. Biedermann, Stärke, Stärkekörner und Stärkelösungen, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol., 1920, CLXXXII, S. 168.

[5]) M. Samec, Studien über Pflanzenkolloide, XXII, Über die nach verschiedenen Methoden dargestellten Kartoffel-Amylopektine, Biochem. Zeitschr., 1929, CCV, S. 104.

[6]) G. Malfitano u. M. Catoire, Zum Micellarzustand der Stärke, Kolloidzeitschr., 1928, XLVI, S. 3.

blau gefärbten (wahrscheinlich mineralfreien organischen) Polymeren, als Amylozellulose Komplexe aus Amylosen und Silikaten, als Amylopektine solche aus Amylosen und erdalkalischen Phosphaten, als Dextrine bestimmte Depolymerisationsprodukte der Amylose.

Die Ursache dafür, daß sich die Bestandteile der Stärkekörner gegen Jod verschieden verhalten, suchen Samec u. Blinc[1]) in Verschiedenheiten der Oberfläche, auf die auch das ultramikroskopische Verhalten ihrer Sole hinweist.

Nach Ling u. Nanji[2]) beträgt der Gehalt an Amylose in allen Stärken, welche nur aus Amylose und Amylopektin bestehen 66,6 %, der Rest entfällt auf das Amylopektin. Die Amylose ist in mehr als einer physikalischen Form vorhanden und möglicherweise in verschiedenen Hydratationsgraden. Etwa 25 % der Amylose bilden einen aus Sphäriten bestehenden kristallinischen Kern um den Nabel des Kerns herum. Dieser Anteil kann durch Wasser oder verdünntes Alkali herausgelöst werden. Der Rest ist in kolloider Form in den Amylopektin-Lagen dispergiert. Man kann die Gesamtmenge der Amylose entfernen, wenn man Stärkekleister mit Malzdiastase bei 50° behandelt. Amylose wird dadurch in Maltose, Amylopektin in α, β-Hexa-Amylose übergeführt.

Karrer u. v. Krauss[3]) stellten aus Stärkekleister durch Zentrifugieren drei Fraktionen dar, eine obere klare dünnflüssige (A), eine untere, nicht durchsichtige hochviskose Schicht (C) und die Waschwässer der Schicht C (B).

Sie fanden, daß die nichtkleisternde A-Fraktion beträchtliche Mengen Phosphor enthielt, daß also eine Parallelität des Kleisterungsvermögens und der Viskosität einerseits, des Phosphorgehalts andererseits nicht besteht. Auch Kieselsäure- oder Eiweißgehalt können für das verschiedenartige physikalische Verhalten der Stärkefraktionen nicht verantwortlich gemacht werden. Die wässerige Lösung der A- und B-Fraktionen wird mit Jod rein blau, die der C-Fraktion mit wenig Jod blau, mit etwas mehr Jod violett.

Taylor u. Walton trennen α- und γ-Amylose nach Vorbehandlung mit Salzsäure, Lösen in wässerig-weingeistiger Lösung von Ammonrhodanid und Fällen mit Weingeist durch Elektrophorese (Elektrodenspannung 220 V.).

Die Stärkekörner zeigen einen Kern (Bildungszentrum), den die Stärkesubstanz in Schichten umgibt. Die Schichten sind Zuwachszonen, die sich durch verschiedene Dichte auszeichnen; substanzreiche und wasserarme Schichten wechseln wahrscheinlich mit substanzärmeren und wasserreichen ab. Liegt der Kern im Zentrum des Chromatophors, dann wachsen die Schichten gleichmäßig (zentrisch geschichtetes Korn), liegt der Kern mehr an der Seite des Chromato-

[1]) M. Samec u. M. Blinc, Studien über Pflanzenkolloide, XXIII, Zur Kenntnis der Erythrosubstanzen, Kolloidchem. Beihefte, 1930, XXX, S. 162.

[2]) A. R. Ling u. D. R. Nanji, Studies on starch Part II. The constitution of polymerised amylose, amylopectin and their derivatives, Journ. of chem. soc., London 1925, CXXVII, S. 629.

[3]) P. Karrer u. E. v. Krauss, Polysaccharide XXXX. Beitrag zur physikalischen Struktur der Stärke. Helv. chim. Acta, 1929, XII, S. 1144. — T. C. Taylor u. R. P. Walton, Journ. Amer. Chem. soc. 51, 3431; Chem. Zentralbl., 1930, I, S. 966.

phors, so wird das Wachstum einseitig gefördert (exzentrisch geschichtetes Korn). Der Kern ist stes wasserreich und kann bei weiterem Wachstum resorbiert werden. Beim Eintrocknen zerreißt zuweilen die Stärkesubstanz und an Stelle des Kernes entsteht ein Hohlraum oder ein Spalt.

Außer der — bisweilen fehlenden — Schichtung ist bei vielen Stärkekörnern teils direkt, teils nach der Einwirkung von Alkalien, Säuren oder Enzymen eine radiale Streifung zu beobachten, die optisch auf der Anordnung der mikroskopisch sichtbaren Micellarverbände (Naegeli) oder Trichite (A. Meyer) beruht.

Will man Gestalt und Struktur von Stärkekörnern untersuchen, so muß jede Vorbehandlung vermieden werden, die eine Quellung der Körner verursacht.

Die Hüllhaut der Stärkekörner läßt sich mit Jod und Schwefelsäure sichtbar machen. Am besten eignet sich hierzu Weingeistmaterial. Auch Drogen liefern gute Objekte. Die Körner quellen etwas, die Hüllmembran wird erst gelb, dann bräunlich, schließlich rötlich. Das nachstehende einfache Verfahren lieferte Tunmann bessere Erfolge: Etwas Kartoffelstärke (Handelsprodukt) wird in Wasser unter Deckglas zweimal bis zur Blasenbildung erhitzt. Nach dem Erkalten sehen wir die verquollenen Hüllen, teils zusammengeballt, teils einzeln liegend. Nun wird ein kleiner Tropfen Jodjodkalium zugesetzt (0,1 Jod : 100,0). In dem Untersuchungstropfen erscheint ein hellblauer, flockiger oder kleinkörniger Niederschlag, der zuvor (ohne Jodzusatz) kaum zu erkennen war. Der größere Teil der Hüllen ist, vorzüglich an der Peripherie, mehr oder weniger stark violett oder bräunlich gefärbt. Doch wird man stets einzelne, zwar nur an einer Seite, aber dort gänzlich gesprengte Hüllen finden, die nur eine schwache Gelbfärbung aufweisen (Fig. 169).

Der Wassergehalt der Stärkearten schwankt. Einige Stärkesorten (des Handels, lufttrocken) hatten nach Hartwich und Wichmann nachstehenden Wassergehalt: Triticum sat. 11,68, Oryza sat. 11,81, Zea 12,54, Maranta arund. 13,22, Solanum 14,71, Canna edulis 15,53 %. Der Wassergehalt der Stärke in der lebenden Zelle ist ein anderer und steht im Zusammenhang mit dem Wassergehalt der Zelle. Bei längerem Liegen in Wasser quellen die Stärkekörner auf, womit bei der Angabe von Größenverhältnissen zu rechnen ist. Die durch Quellung bewirkte Größenzunahme ist nicht bei allen Körnern einer Pflanze gleich und hängt von dem Bau der einzelnen Körner ab. Bei Solanum fand Tunmann Unterschiedswerte bis zu 4,3 %[1]).

Im Gewebe sind die Stärkekörner infolge ihrer Gestalt und ihrer optischen Eigenschaften meist ohne weiteres zu erkennen. Selbst der

[1]) Genau bezeichnete Körner wurden lufttrocken und nach fünftägigem Liegen in Wasser gemessen.

Nachweis kleinster Stärkekörnchen, der einmal (besonders in Drogen und Herbarpflanzen) Schwierigkeiten bereiten könnte, ist mit Jodreaktionen leicht zu führen. Die Untersuchungen werden Größe und Gestalt der Körner ermitteln (siehe oben) und, wenn die Körner nicht zu klein sind, auf ihren Bau (Schichtung und radiale Struktur) eingehen.

Der Beweis, daß die Schichtung auf einem verschiedenen Wassergehalt der einzelnen Schichten beruht, läßt sich bei geschichteten Stärkekörnern in einfacher Weise durch Vergleich feuchter und völlig ausgetrockneter Körner erbringen, die in Kanadabalsam zur Beobachtung gelangen (Zimmermann, Mikrot.). Durch Ausfrieren verschwindet die Schichtung ebenfalls. Daher zeigt die Stärke der Chuna, einer aus gefrorenen Kartoffeln in den Höhen der Anden Südamerikas bereiteten Konserve, keine Schichtung; sie tritt erst bei längerem Liegen der Körner in Wasser wieder auf (Lit. S. 803, 1). Je schärfer die Schichtung hervortritt, um so höher ist der Wassergehalt der einzelnen Körner, dies geht aus den oben angegebenen Werten hervor. Oft ist die Schichtung schwer, zuweilen gar nicht sichtbar. Sie tritt im polarisierten Lichte oder nach längerem Liegen der Körner in Wasser schärfer hervor. Die Schichten lassen sich nach längerer Einwirkung von stark verdünnter Chromsäure (Weiss und Wiesner) besser erkennen oder wenn man Jodjodkalium in starker Verdünnung und ganz langsam einwirken läßt, wobei sich die wasserarmen Schichten färben (Binz)[1].

Man kann ferner das Versilberungsverfahren von Correns[2]) mit Vorteil benutzen. Aus den Objekten (am besten lufttrockenen) werden die Stärkekörner durch Abschaben isoliert, in flachen Schälchen durch Auswaschen mit Wasser, das mehrmals abgegossen und erneuert wird, gereinigt und bei 50° ausgetrocknet. Die getrockneten Körner werden in einer Porzellanschale mit 2—5proz. wässeriger Silbernitratlösung durchfeuchtet, oberflächlich abgetrocknet, darauf ohne Auswaschung in 1proz. Chlornatriumlösung gebracht und stark belichtet. Nach vollendeter Reduktion des entstandenen Chlorsilbers wird die Flüssigkeit sorgfältig abgegossen, die am Boden befindliche Stärke mit einem Glasstabe auf den Objektträger gebracht und nach dem Eintrocknen in Kanadabalsam eingeschlossen. Die größeren Körner zeigen meist in den stärker quellungsfähigen Schichten ausgeschiedene Silberpartikelchen oder eine homogene Graufärbung.

Mit dem schärferen Hervortreten der Schichten wird vielfach auch die radiale Struktur der Körner, die radiale Anordnung der Trichite,

[1]) Binz, Beitr. Morph. u. Entwicklung. d. Stärke, Flora, 1892, Zürcher Diss.

[2]) C. E. Correns, Zur Kenntnis der inneren Struktur der vegetabilischen Zellmembranen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1891, XXIII, S. 331.

besser sichtbar werden. Hierzu kann Erhitzen in Xylolalkohol (Lit. S. 307, 1), dann außer verdünnten Säuren auch Kalziumnitrat[1]) dienen. Kartoffelstärke zeigt besonders gut die radiale Struktur nach Behandeln mit verdünnten Säuren bei nachfolgendem Aufquellen in Wasser (A. Meyer, Stärkekörner, S. 122). Bei der Maisstärke wird die radiale Struktur sichtbar nach dem Kochen (½ Minute) mit 1 ccm Chloroform, dem einige Tropfen Chromsäure zugesetzt sind (Buscalioni)[2]). Durch Chloroform wird die Einwirkung der Chromsäure beschleunigt.

Zum Nachweis der inneren Struktur der Stärkekörner wendet Gertz[3]) folgendes Verfahren an: Die Stärke wird zunächst mit Hilfe von Methylalkohol oder Äther entwässert. Nachdem man die völlig trockene Stärkemasse pulverisiert hat, werden einige isolierte Körner auf dem Objektträger mit verdünnter Schwefelsäure behandelt. Es ergab sich, daß die meisten Stärkekörner auf ihrer Oberfläche mit zarten, allmählich heranwachsenden blaugefärbten Kriställchen (Trichiten) umkleidet waren und daß sich schließlich das ganze Korn in ein aus zahlreichen Nadeln zusammengesetztes Gebilde verwandelte.

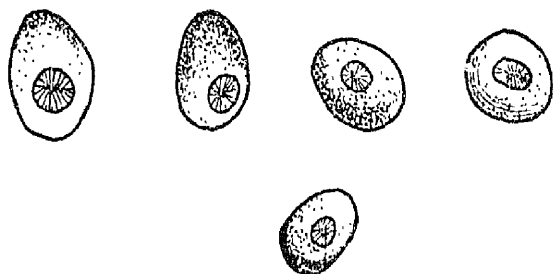



Fig. 166. Maranta-Stärke nach Behandlung mit Chloral die radiale Anordnung der Trichite zeigend

Behandelt man Stärkekörner enthaltendes Gewebe nach dem Richterschen Verfahren zum Eisennachweis (s. S. 200), läßt aber 24 Stunden in der 10proz. Salzsäure liegen, so sieht man an den Stärkekörnern (von Richter bei Bohne und Erbse beobachtet) „den Spalt je nach der Größe der Körner in den kleineren aus der Peripherie stammenden Zellen als intensiv dunkelblauen Strich, in den mehr zentral gelegenen großen Zellen als breiten reichlich mit Sprüngen versehenen Spalt von gleicher Farbe hervortreten, von dem vielfach, Porenkanälen vergleichbare blaue, gerade Striche abgehen, die ihrerseits wieder durch den Schichten des Stärkekorns folgende den zentralen Spalt konzentrisch umgebende blaue Ellipsenzonen verbunden erscheinen".

Zur Untersuchung von Stärkekörnern verwendet Netolitzky eine Lösung von 1 Teil Ätzkali in 9 Teilen 96proz. Weingeist, die die Stärke

[1]) H. Kraemer, The structur of the starch grain, Bot. Gaz., 1902, XXXIV, S. 341.

[2]) L. Buscalioni, Sulla struttura d. granuli d'amido d. mais, Nuov. Giorn. bot. Ital., 1891, XXIII, S. 45.

[3]) O. Gertz, Om strukturen hos stärkelsekorn, Bot. Notiser, 1922, S. 113, nach Bot. Zentralbl., 1922, N. F. I, S. 463.

in der Kälte unverändert läßt[1]) aber beim Erwärmen den Kern deutlicher werden läßt; nach Zusatz von verdünntem Weingeist oder Wasser wird das Stärkekorn allmählich angegriffen.

Nach Beijerinck[2]) umgibt eine äußere Schicht von Amylozellulose einen Kern von Granulose. Ließ er zu Kartoffelstärke, die durch Kochen mit der hundertfachen Menge Wasser 70 % Wasser — das Maximum — aufgenommen hatte, Tanninlösung treten, so entstand eine Fällung im Inneren der durch die Amylozellulose umschlossenen Blase.

Will man die Entwickelung der Stärkekörner studieren, dann müssen die Chloroplasten möglichst erhalten bleiben, das Gewebe muß fixiert werden. Versuchsobjekte sind Pellionia (Stengel, Blatt, Solanum tub. (junge Knollen), Adoxa moschatellina (Speicherschuppen, Rhizom), Phajus grandif. (Knollen), Canna (Rhizom). Fixierung mit Flemming, Sublimatalkohol (5 %), konzentrierte wässerige Pikrinsäure oder Pikrinsäuresublimat. Die Pikrinsäurelösungen werden mit Alkohol, die anderen Flüssigkeiten einige Stunden in fließendem Wasser ausgewaschen. Dann folgt Entwässern, Chloroform, Einbetten in Paraffin, Mikrotomschnitte, Objektträgerfärbung. Chloroplastenfärbung s. S. 776. Bei der Färbung der Stärke leisten Methylviolett oder Gentianaviolett gute Dienste. Hierbei werden die Stärkekörner violett, die Plastiden und das Cytoplasma rot. Die Färbung wird verbessert, wenn die Schnitte nach dem Abspülen „einige Sekunden lang mit ziemlich konzentrierter wässeriger Lösung von Orange G behandelt werden“ (Salter). Man kann ferner mit Flemming fixieren, dann 2—3 Tage mit einer durch Anilinwasser verdünnten Safraninlösung und 5 Minuten mit Gentianaviolett färben. Kraemer[3]) färbt zunächst die wasserreichen Schichten und das Zentrum mit verdünntem wässerigen Gentianaviolett (Solanum) oder Safranin (Triticum) und läßt eine Nachbehandlung mit Jodlösung zur Färbung der übrigen Teile des Kornes folgen.

Um Stärke in Mitochondrien zu färben, fixiert Guilliermond[4]) nach Champy und färbt nach Kull.

Das Stärkekörnchen erscheint so sofort nach seiner Bildung blau (durch das Toluidinblau) inmitten des durch Fuchsin rotgefärbten

[1]) Nur die Form der Stärke bleibt unverändert, in chemischer Hinsicht ändert sie sich, da Kalium gebunden wird.

[2]) M. W. Beijerinck, „Structure of the starch-grain“. Proceedings of the section of sciences der Kon. Akad. van Wetenschappen te Amsterdam, 1912, XIV, 2. Teil, S. 1107.

[3]) H. Kraemer, Struct. of starch grain, Bot. Gaz., 1902, XXXIV, S. 341.

[4]) A. Guilliermond, Sur une méthode permettant de colorer dans la cellule végétale les grains d'amidon au sein des mitochondries, Compt. rend. soc. biol., 1916, LXXIX, S. 809.

Chondriokonten und hebt sich scharf ab von dem durch Aurantia orange gefärbten Cytoplasma.

Weitere besonders haltbare Färbungen haben C. W. Dodge (Durable stain f. starch., Journ. Micr., 1898, I, 131), J. H. Schaffner (Perm. st. f. starch, Journ. Micr., 1898, I, 181), E. Belzung (Nouv. rech. s. l'origine d. grains d' midon et d. grains chlorophyll, Ann. d. sc. nat. Bot., 1891, XIII, 1) u. a. angegeben.

Näher angeführt sei noch das Tannin-Brechweinsteinverfahren (Rawitz). Die Objekte werden mit Pikrin-Eisessig-Schwefelsäure, Chromsäure oder mit Chrom-Osmium-Essigsäure fixiert. Bei Fixierung mit Osmiumsäure müssen die Präparate mit Terpentinöl oder mit Wasserstoffperoxyd nachgewaschen werden. Němec[1]) bringt Mikrotomschnitte nach vorheriger Überführung in Wasser auf 10 bis 60 Minuten in 2proz. wässerige Tanninlösung, spült in Wasser ab (1 Minute) und legt sie 5—15 Minuten in 1½proz. wässerige Brechweinsteinlösung, dann Auswaschen (3 Minuten), Gentianaviolett (30 Minuten), Auswaschen (5 Minuten), schließlich Terpentin, Xylol, Kanadabalsam. Die Präparate halten sich über 10 Jahre (Stärkekörner stark violett, Cytoplasma grau, Zellmembranen, besonders verschleimte, schwach violett).

Da die Mobilmachung der Stärke in der Pflanze durch Enzyme (Diastase) bewirkt wird, so findet man während der Entleerung der Reservestoffbehälter stets Körner, die ihren Bau in klarer Weise erkennen lassen. Seit langem benutzt man als Übungsobjekte keimende Getreidekörner. Inerhalb der Zelle ist die Betrachtung der einzelnen Körner von verschiedenen Seiten schwierig und keimende Samen oder treibende Knollen stehen nicht jederzeit zur Hand. Daher verfolgt man die Einwirkung von Speichel oder Diastase (eine filtrierte und mit etwas Chloroform versetzte Lösung von 1 Teil Malz in 3 Teilen Wasser) auf isolierte Stärkekörner. Um die Diastasewirkung gut verfolgen zu können, müssen die Körner in einem dickflüssigen Medium (konzentriertes Glyzerin)[2]) gerollt werden. Die Einwirkung zeigt sich nicht überall in gleicher Weise. Bei exzentrisch geschichteten Stärkekörnern (Solanum, Lilium candidum) erfolgt von außen nach innen und auf allen Seiten gleich stark ein Abschmelzen; bei Leguminosen und bei mit langen Spalten versehenen Körnern geht das Abschmelzen an der Außenseite so lange gleichmäßig vonstatten, bis der Spalt an einer Stelle geöffnet ist. Durch die Öffnung dringt das Enzym in den Spalt ein und wirkt nun ebenfalls von innen, die Risse werden erweitert, das Korn zerfällt in

[1]) B. Němec, Inverse Tinkt., Ber. bot. Ges., 1906, XXIV, S. 528.

[2]) G. Krabbe, Unters. üb. d. Diastaseferment unt. spez. Berücks. seiner Wirkg. auf Stärkekörner in d. Pfl., Jahrb. f. wiss. Bot., 1890, XXI, S. 520.

kleine Teilchen, die schließlich gelöst werden. Bei verschiedenen Gramineen (Hordeum, Secale, Zea) zeigt die Diastase an einzelnen Stellen eine vermehrte Tätigkeit, Löcher und Kanäle entstehen, die unter einander in Verbindung treten, bis der Zerfall des Stärkekornes erreicht worden ist. In Lösung begriffene Stärkekörner, welche ihre Struktur besonders die radiale Stellung der Trichite gut erkennen lassen, treffen wir oft in den Mahlprodukten der Kunstmühlen an. Ein schönes Belegpräparat liefert der Belfaster Klebstoff (Fig. 167).

Verschiedene Stärken verhalten sich gegenüber Diastase verschieden widerstandsfähig[1]). Die Verzuckerungsgeschwindigkeit sinkt in der Reihenfolge: Reis-, Weizen-, Arrow-root, Kartoffelstärke. Nagai[2]), der die Auflösung eines Stärkekorns durch Diastase im Ultramikroskop verfolgte, beobachtete, wie bei einem gewissen Quellungsgrade in den äußeren Schichten plötzlich Teilchen aufzuleuchten beginnen, den Zusammenhang verlieren, di Brownsche Bewegung zeigen und nach und nach verschwinden.

Fig. 167. Stärkekörner, in Auflösung begriffen, zum Teil ihre Struktur anzeigend; a) aus Weizenmehl (Schweizer Handelsprodukt), b) aus der Firmas-Paste (Klebstoff) von Caw, Stevenson u. Orr, Belfast (Tunmann)

In manchen Fällen (Wurzelhaube wachsender Würzelchen, Stärkescheiden oberirdischer Organe, Spaltöffnungen, Milchsaft von Euphorbien) ist die Stärke gegenüber den auflösenden Enzymen sowohl innerhalb als außerhalb der Pflanze sehr widerstandsfähig. Ziegenspeck[3]) unterscheidet sie als „Sparstärke" von der „Nährstärke".

Ähnliche Erfolge wie mit Diastase erzielen wir mit dem Rösten. Das Röstprodukt der Kartoffelstärke, das Handelsdextrin, wird stets zur Verfügung stehen. Wir können uns aber aus jeder beliebigen Stärkeart das Röstprodukt selbst herstellen. Auf einem Deckglassplitterchen wird etwas Handelsstärke (oder Mehl) über der Flamme so lange vorsichtig erwärmt, bis die Masse eine tiefbraune Färbung (beim Halten des Deckgläschens gegen das Licht) angenommen hat. Das Deckglas-splitterchen mit der Masse wird auf den Objektträger gelegt, die zusammengebackene Masse mit etwas Wasser angerührt und ein Deckglas aufgelegt. Ein Teil der Körner wird verkohlt sein; andere Körner werden sich kaum verändert haben, außer diesen werden wir stets Körner finden, die mehr oder weniger stark dextriniert sind (Fig. 168). Je weiter die Dextrinierung bei den einzelnen Körnern oder bei den

[1]) R. Chodat, J. W. Ross et M. Philia, Sur la spécificité des amidons, Compt. rend. soc. phys. et hist. nat. Genève, 1924, XLI, S. 122.

[2]) K. Nagai, Ref. 52 401 in Ber. über ges. Physiol., 1925.

[3]) H. Ziegenspeck, Über Sparstärke, Bot. Archiv, 1924, VII, S. 251.

einzelnen Schichten der Körner vorgeschritten ist, desto reiner werden bei Zusatz von Jodreagentien rote Färbungen entstehen (s. unten unter Amylodextrinstärke). Die gerösteten Stärkekörner zeigen bei Betrachtung in Öl, Anilin oder Pyridin im Kern eine Luftblase oder einen größeren mit Luft erfüllten Raum von zackigem Umriß, die Masse des Kornes erscheint etwas durchsichtiger, im übrigen treten Abweichungen von normalen Körnern nicht hervor. Die Umwandlungserscheinungen, die im allgemeinen die gleichen sind wie bei der Diastasewirkung, bemerken wir erst in Wasserpräparaten (Fig. 168).

Andererseits schwindet die Schichtung durch wasserentziehende Mittel u. a. (konzentriertes Glyzerin, Benzol, fette und ätherische Öle, Pyridin, Anilin), sowie bei der Verkleisterung oder sehr starkem Aufquellen (Erwärmen mit Wasser, Alkalien, Chloralhydrat u. a.). Bei der Verkleisterung mit Wasser ist ein Erwärmen auf 50—80° erforderlich. Die Höhe der Temperatur ist für die einzelnen Stärkesorten verschieden (50—90°) und diagnostisch verwertet worden (Lippmann, Wittmack); in der Mikrochemie wird man hiervon absehen, da das genaue Einhalten bestimmter Wärmegrade etwas umständlich ist. Die Stärke von Oryza verkleistert vollkommen bei 61,2°, von Solanum, Zea, Castanea bei 62,5°, Triticum bei 67,5°, von Maranta arund. bei 70°. Bei der Verkleisterung quillt die Stärkesubstanz um das 25fache und mehr bis zur mikroskopischen Unkenntlichkeit, sprengt die Hüllhäute der einzelnen Körner, löst sich aber nicht auf; es bildet sich eine hyaline, strukturlose Masse, in der die zusammengeballten Häute sichtbar sind.

Fig. 168. Dextrinierte Stärkekörner, durch trockenes Erhitzen auf dem Deckglase erhalten, in Wasser liegend, *a*) Solanum, *b*) Triticum (Tunmann)

Die Temperaturen, bei denen Wasser eine vollständige Lösungsquellung der Stärkekörner hervorruft, sind nach Samec: Für Reis 72°, Mais 68°, Roggen 55°, Weizen 62°, Kartoffeln 72°.
Den gleichen Erfolg haben Alkalien, bei denen eine Anwendung von Wärme nicht erforderlich ist. Bei stärkereichen Geweben benutzt man diese Verfahren zum Aufhellen (S. 46).

Die Quellung wird außer durch heißes Wasser durch Säuren, Alkalien und viele Salze befördert; von Nichtelektrolyten befördern Harnstoff und Chloralhydrat die Quellung.

Nach Lepeschkin[1]) besteht die Quellung der Stärke in heißem Wasser

---

[1]) W. W. Lepeschkin, Über die Stärkequellung in lebenden und toten

aus zwei selbständigen Vorgängen, einer chemischen Reaktion zwischen Stärkepolysacchariden und Wasser, die zur Bildung von Amylose und Amylopektin führt, und aus der Quellung der letzteren in Wasser (Kleisterbildung).

Auch bei der Verquellung der Stärkekörner durch Natriumsalizylat, Lauge und Säure verhalten sich die Stärkekörner verschiedener Pflanzen oft verschieden.

Natriumsalizylat (wässerige Lösung 1+11) wirkt auf Stärkekörner (Lenz)[1] in verschiedener Weise ein. Die Stärke kommt in einen hängenden Tropfen der Lösung und wird bei Zimmertemperatur der Dauerbeobachtung unterworfen. Roggenstärke ist nach 24 Stunden zum großen Teile, nach einer Woche gänzlich verquollen; nach längerer Zeit sind nur die zusammengefallenen Hüllen sichtbar. Weizenstärke widersteht längere Zeit, doch ist nach einer Woche das Polarisationskreuz ebenfalls nicht mehr zu erkennen und schließlich bleiben die entleerten Häute zurück. Hingegen verquollen von Maranta- und Kartoffelstärke innerhalb 24 Stunden nur wenige Körner im Salicylat und selbst nach 17 Monaten ist das Polarisationskreuz noch sichtbar. Man kann die Stärkearten einteilen in solche, die durch Salizylat in absehbarer Zeit nicht angegriffen werden, und in andere, die mehr oder weniger rasch gelöst werden. Nur die Kornsubstanz geht in Lösung, nicht die Hüllhaut. Die Beschaffenheit der Hüllhaut, ihre größere oder geringere Dicke, beeinflußt das schnellere oder langsamere Lösen der Kornsubstanz (der Sphärokristalle). Aus diesem Grunde lösen sich im allgemeinen größere Körner, deren Hüllhaut infolge der Spannung zarter ist, schneller als kleinere Körner. Die Reaktion hat diagnostische Bedeutung.

Das Verhalten von Stärkekörnern gegen Lauge und Säure ist von L. Rosenthaler[2]) studiert worden. $\frac{1}{2}$-N-Kalilauge verquillt alle Stärkekörner sofort, $\frac{1}{10}$-N-Lauge wirkt zu langsam, um praktisch verwendbar zu sein, zu praktischen Zwecken erwies sich $\frac{1}{6{,}25}$-N-Kalilauge (0,9proz.) als geeignet. Die Ergebnisse mit einigen der wichtigeren Stärkekörner sind aus umstehender Tabelle ersichtlich.

Salzsäure wirkt erst in Konzentrationen verquellend, die weit höher als bei Kalilauge liegen. 25proz. Salzsäure wirkt zu energisch, 12½proz.

Zellen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1925, XLIII, S. 16. — Derselbe, Étude sur les réactions chimiques pendant le gonflement de l'amidon dans l'eau chaude, Bull. soc. bot. Genève 1922.

[1]) W. Lenz, Ein neues Untersuchungsverfahren für Stärkekörner, Apoth.-Ztg., 1910, XXV, S. 778.

[2]) L. Rosenthaler, Beobachtungen an Stärkekörnern, Schweiz. Apoth.-Ztg., 1923, LXI, S. 654.

Verhalten von Stärke gegen $N/_{6,25}$ -Kalilauge (0,9 proz.)

Stärke	Sofort	Nach 10 Minuten	Nach 30 Minuten
Kartoffel	Die größten Körner verquellen sofort, die mittleren wenig nachher, in den kleinsten erweitert sich der Kern	Der größte Teil verquollen; im wesentlichen nur noch die kleinsten erhalten.	Wie vorher
Maranta	Keine auffallende Veränderung	Spalten teilweise erweitert u. vermehrt; einzelne Körner, besonders verletzte, verquollen oder aufgequollen, der größte Teil ist nicht auffallend verändert	Verquellung und Aufquellung sind fortgeschritten; der größte Teil der Körner nach wie vor ohne auffallende Veränderung
Sago	Keine auffallende Veränderung	Einzelne Körner verquollen, viele andere aufgequollen und mit zahlreichen neuen Spalten durchsetzt	Verquellung fortgeschritten; doch noch zahlreiche Körner ohne wesentliche Veränderung
Weizen	Sofort keine auffällige Veränderung; doch tritt sehr bald Aufquellung ein	Viele Körner verquollen, andere stark aufgequollen, andere besonders Kleinkörner, nahezu unverändert	Fast alles bis auf einige Hüllen aufgelöst
Roggen	Die meisten Körner verquellen sofort; nach 1 Minute nur noch Kleinkörner unverändert	Nur noch Hüllen vorhanden	Alles aufgelöst
Gerste	Die Verquellung beginnt bei den größeren sofort	Viele Körner verquollen, andere stark aufgequollen, nur wenige ohne auffallende Veränderung	Was nicht verquollen, ist mehr oder minder stark aufgequollen
Reis	Keine auffällige Veränderung	Einzelne Körner verquollen, andere aufgequollen, der größte Teil ohne auffällige Veränderung	Die meisten Körner noch nahezu unverändert
Mais	Keine auffällige Veränderung	Einzelne Körner verquollen, andere aufgequollen, der größte Teil ohne auffällige Veränderung	Wie vorher

Verhalten von Stärke gegen 15,5proz. Salzsäure

Stärke	Sofort	Nach 10 Minuten	Nach 30 Minuten
Kartoffel	Einzelne Körner verquellen	Die größeren Körner sind verquollen, mittlere und kleine noch vorhanden	Der größte Teil aller Körner verquollen, kleine noch unverquollen
Maranta	Keine auffällige Veränderung	Die größten Körner meist verquollen	Viele Körner verquollen, der größte Teil nicht
Sago	Keine auffällige Veränderung	Einzelne Körner verquollen, manche stärker zerklüftet	Nur wenige Körner verquollen. Zerklüftung weiter fortgeschritten
Weizen	Keine auffällige Veränderung	Einzelne Körner verquollen, andere aufgequollen	Fast nur noch Hüllen
Roggen	Die größeren Körner verquellen	Fast nur noch Hüllen	Wie vorher
Gerste	Einzelne Körner verquellen	Viele Körner verquollen, ein erheblicher Teil noch unverquollen	Viele Körner verquollen, ein Teil unverquollen
Reis	Keine auffällige Veränderung	Wie vorher	Wie vorher
Mais	Keine auffällige Veränderung	Einzelne Körner verquollen	Viele Körner verquollen, die meisten andern aufgequollen, nur wenige unverändert.

zu schwach; für praktische Zwecke ist die 15,5proz. am geeignetsten. Über einige damit erzielte Ergebnisse unterrichtet vorstehende Tabelle.

Stärkekleister gibt Fällungen mit Kalk- und Barytwasser und auch mit Bleiessig. Die Fällungen mit Tannin, Brom-Bromwasserstoff, Silikowolframsäure und Posphormolybdänsäure treten bei verschiedenen Stärken in verschieden starker Weise ein[1]).

Die wichtigste Reaktion der Stärke ist die Blaufärbung mit Jod, die Jodstärkereaktion.

Die Jodreaktion wurde 1815, bald nach der Entdeckung des Jods, von Colin und Gaulthier de Claubry (Schweigg. Journ., 1815, XIII, 453) aufgefunden und ist für Stärke ungemein charakteristisch, da wir keine weiteren geformten Zellinhalte kennen, die in gleicher Weise reagieren. Nur das in den Zellen gelöste Glykosid Saponarin (S. 612) wird mit Jod blau, ebenso Narcein (S. 473), dann ein wasserlösliches Kohlehydrat, welches Bourquelot (Bull. soc. mycol.,

[1]) L. Rosenthaler, Über die Fällbarkeit von Kohlenhydraten und Glykosiden durch Alkaloidfällungsmittel, Pharmac. Acta Helvetiae, 1928, III, S. 93.

1891, VII, 155) in Boletus pachypus Fr. auffand, von dem es aber noch ungewiß ist, ob es dem Inhalte oder der Membran entstammt. Einige Membranstoffe (Lichenin) werden durch Jod gebläut. Auch „das Gewebe der ganzen Krone" von Paidania melastomacearum Racib. wird mit Jod blau (v. Höhnel, Sitzgsb. Wien. Ak., 1909, CXVIII 1, 830[1]).

Die Frage, welcher Art die Jod-Stärke-Bindung ist, ist noch stark umstritten[2]).

Lottermoser und Ott schließen aus ihren Versuchen mit löslicher Stärke, daß Jod zunächst nach der Adsorptionsisotherme aufgenommen wird; es wird aber kein Gleichgewichtszustand erreicht, sondern langsam immer mehr Jod aufgenommen. Es konnte nicht entschieden werden, ob diese langsame Jodaufnahme ein Lösungsvorgang oder eine chemische Reaktion ist (Kolloid-Zeitschr. 1930, LII, S. 138).

Nach Haller[3]) entsteht die blaue Jodstärke durch Adsorption von Jod an und in der peripheren Schicht des Stärkekorns unter Kondensation von hochdispersen Jodteilchen zu gröberen Aggregaten. Umgekehrt gibt Beijerinck an, daß Kartoffelstärkekörner, die mit soviel Wasser behandelt sind, daß sie gerade imbibiert sind, auf Zusatz von Jod nur im Innern blau gefärbt werden.

Endgültig geklärt ist auch die Frage, wie sich die einzelnen Komponenten der Stärke (s. oben) gegen Jod verhalten, nicht, wie sich aus folgenden Äußerungen ergibt.

Die Blaufärbung der Stärkekörner geht nach A. Meyer von der β-Amylose aus, die sich in den kristallinischen Schichten der Stärkekörner und in Lösung mit Jod bläut; α-Amylose färbt sich im kompakten Zustand damit nur schwach braunrötlich, im Trichitenzustand der Stärkekornschichten intensiv braunrot. Das von Samec[4]) nach verschiedenen Methoden z. B. durch elektrolytische Abscheidung aus einer ½ Stunde auf 120° erhitzten Lösung erhaltene Amylopektin der Kartoffelstärke färbt sich mit Jod rot.

[1]) Außer den genannten gibt es aber noch eine große Zahl von Verbindungen, die sich mit Jod bläuen, so Cholsäure, Euxanthinsäureester, Derivate des α- und γ-Pyrons, Xanthons, Flavons, Thioflavons, 7-Oxy-4-methyl-cumarins, Benzylidenphthalid, basisches Lanthan- und Praseodymazetat.

[2]) Zur Theorie der Jodstärke-Verbindung vgl. u. a. H. v. Euler und St. Bergman, Kolloid-Zeitschr. 1922, XXXI, S. 81. M. Bergman, Ber. deutsch. chem. Ges., 1924, LVII, S. 753. D. Krüger u. E. Tschirch, ebenda 1930, LXIII, S. 826. A. Picket u. H. Vogel, Chem. Zentralbl., 1930, I, S. 2545.

[3]) G. Haller, Beiträge zur Kenntnis der Färbung des Stärkekorns, Kolloid-Zeitschr., 1927, XLI, S. 81.

[4]) M. Samec, Über die nach verschiedenen Methoden dargestellten Kartoffelamylopektine, Biochem. Zeitschr. 205, S. 104.

Stärkekleister im kondensierten Gelzustand zeigt keine Jodreaktion (Wo. Ostwald)[1].

Um eine rein blaue Färbung zu erzielen, ist es nötig, die Jodreagentien (Jodwasser, -alkohol, -jodkalium) nicht in konzentrierter Form anzuwenden. Man benutzt Jodjodkalium mit 1% Jod oder eine Jodlösung, die man frisch bereitet aus 3 Tropfen Jodtinktur (1 : 10) und 2 ccm Wasser. Die beste Blaufärbung geben kleine Jodsplitterchen. Hierzu dient eine Jodverreibung (1 Teil Jod, 5 Teile Bimsstein). Bei zu großem Jodzusatz geht die Blaufärbung schnell in eine braunschwarze Färbung über. Die dunkle Färbung läßt sich durch Auswaschen, schneller durch etwas verdünnte Salzsäure in Blau überführen. Bei Einwirkung von Joddämpfen auf trockene Stärke (ein Jodsplitter wird in das trockene unter Deckglas liegende Präparat gebracht) tritt braunschwarze Färbung ein, die bei Wasserzusatz schnell in Blau übergeht. Läßt man Joddämpfe auf kleine Stärkehäufchen (die Stärke befindet sich auf einer Glasplatte, Jodkristalle werden in einem Uhrglas danebengebracht) einwirken, dann zeigen die verschiedenen Stärkesorten nach 24 Stunden bei makroskopischer Betrachtung eine verschiedene Färbung, Maisstärke schwarzviolett, Getreidestärke taubengrau, Kartoffelstärke gelbgrau, Sago milchkaffeefarben (Dubasc)[2]. Diese Farbentöne kommen durch zurückgehaltene Luft, Größe und Beschaffenheit der Körner zustande. Bringt man von den einzelnen Proben einige Körnchen in Wasser, dann tritt die typische Blaufärbung ein.

Da die Stärkesubstanz wechselnde Anteile an Amylodextrin enthält, welches mit Jodreagentien rötlich wird, so wechselt die Farbe der Jodstärke je nach ihrem Gehalte an Amylodextrin (blau, blauviolett, rötlich-blau). Diagnostisch wichtig ist die Eigenschaft der Jodstärke beim Erwärmen oder Erhitzen sofort farblos zu werden, um beim Erkalten die Färbung ohne erneuten Jodzusatz wieder anzunehmen. Die Jodstärkereaktion wird durch Stoffe, wie Tannin und Alkaloide und andere, die sich mit Jod verbinden, verhindert oder gestört; mit genügendem Jodzusatz läßt sich die Reaktion aber immer erzielen.

Die Fähigkeit, sich mit Jod blau zu färben, verlieren die Stärkekörner durch 1—10proz. Chromsäure oder Chromschwefelsäure. (Hierbei verlieren sie gleichzeitig die Fähigkeit sich mit kochendem Wasser zu verkleistern, C. O. Harz, Amylum in seinem Verhalten gegen Chromsäure, Bot. Centralbl., Beih., 1905, XIX, 45). Durch Kalilauge wird die Jodfärbung sofort aufgehoben, nachfolgender, sehr reichlicher Jodzusatz stellt sie wieder her, ebenso Zusatz von Säuren. Zerstört wird die Färbung durch Ammoniak, Salpetersäure, schweflige Säure, Schwefel-

---

[1]) Wo. Ostwald, Beiträge zur Kolloidchemie des Brotes, Kolloid-Zeitschr., 1919, XXV, S. 26.

[2]) Dubasc, Chem. Ztg., 1904, XXVIII, S. 1149.

wasserstoff, überschüssiges Chloral u. a. Durch Chloroform, Weingeist, Schwefelkohlenstoff u. a. kann man der Jodstärke das Jod entziehen, die Körner werden sofort farblos. Auch abnorme Temperaturen können die Blaufärbung verhindern. Němec (Percept. d. Schwerkraftr., Ber. bot. Ges., 1902, XX, 339) fand, daß sich die Stärke von Allium cepa (Wurzel), nachdem sie abnorm hohen oder niedrigen Temperaturen ausgesetzt war, mit Jod nur gelb färbte. Erst nach Vorbehandlung mit stark verdünnten Mineralsäuren erfolgte Blaufärbung durch Jod.

Die Jodreaktion tritt in gleicher Weise bei Stärkekleister ein. Kleisterballen finden sich in Drogen, die erhitzt oder abgebrüht werden (Tubera Salep und Jalapae, Rhiz. Curcumae, chinesischen Rhusgallen, zuweilen in Tub. Aconiti und früher in einigen Sarsaparillen). Zum Nachweis der Stärke in Drogen empfiehlt Lagerheim[1]) Jodmilchsäure (einige Jodsplitter in heißer sirupdicker Milchsäure gelöst), durch die das eingetrocknete Gewebe seine natürliche Gestalt wieder annimmt. Jodchloral leistet die gleichen Dienste, ebenso Phenol, in dem einige Splitter Jod gelöst sind (Naumann).

Noch besser ist nach Kisser (Emich-Festschrift 1930, S. 175) ein Gemisch von 5 Teilen Jod-Phenol und 3 Teilen Jod-Chloralhydrat, die damit bei frischen Schnitten eintretende Zerstörung der Chloroplasten läßt sich bei Verwendung von in Weingeist konserviertem und gehärtetem Material vermeiden. Weiter empfiehlt Kisser noch ein Gemisch von 8 Teilen Jod-Phenol, 4 Teilen Jod-Alkohol (oder ebensoviel Glyzerin) und 1 Teil Wasser.

Die Bestrebungen, die blaue Jodfärbung der Stärke „haltbar" für Dauerpräparate zu machen, sind noch nicht erfolgreich gewesen. In den Dauerpräparaten fehlt der für die Blaufärbung nötige Wassergehalt. Man ist bisher nur zu einer haltbaren Braunfärbung gekommen. Harz[2]) erzielt dauernde Braunfärbung mit Jodparaffin (Jod 1, Paraff. liquid. 100). Die Stärkekörner werden gelb bis braun. Die einzelnen Stärkesorten zeigen bei dem Verfahren ein etwas verschiedenes Verhalten. Die Stärke von Cassave bleibt farblos. Auch die Körner der gleichen Pflanze wechseln in der Farbe. Dies hängt jedenfalls mit der verschiedenen Struktur und dem Wassergehalt der einzelnen Körner zusammen. Zu Dauerpräparaten werden die Körner mit Jodjodkalium durchfeuchtet; man läßt auf dem Objektträger eintrocknen, dann wird ein Tropfen Jodparaffin zugefügt und das Deckglas mit 10proz. Gelatine umrandet. Rein blau gefärbte Körner hat Tunmann nicht beobachtet. Fischer (Lit. S. 306, 5) läßt die mit weingeistiger Jodlösung überfärbten

---

[1]) G. Lagerheim, Üb. d. Anwend. v. Jodmilchsäure z. mikr. Unters. v. Drogen usw., Svensk Farm. Tidskrift, 1901, V.

[2]) C. O. Harz, Jodparaffinöl, ein neues Mikroreagens und Einbettungsmedium, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1904, XXI, S. 25.

Körner an der Luft eintrocknen und bringt Kanadabalsam darauf. Der Überschuß der Farbe löst sich farblos im Kanadabalsam, die Körner bleiben dauernd braun bis gelb gefärbt. Etwas umständlicher ist die Methode Lagerheims[1]. Die mit Jodjodkalium gefärbten Körner werden mit Silbernitrat behandelt, der Sonne ausgesetzt und mit einem Hydrochinonentwickler entwickelt. Hierbei wird eine braune Färbung erzielt. Für Halbdauerpräparate ist eine Jodrohrzuckerlösung geeignet (konzentrierte Rohrzuckerlösung mit 1 % Jod und etwas Kaliumjodid angerieben, Jod im Überschuß). Die Braunfärbung (nur einzelne Körner sind auf kurze Zeit blau) hält sich über ein Jahr, Deckglasumrandung ist nicht erforderlich (Tunmann, Lit. S. 811, 3). Die Körner gelangen direkt in die Zuckerlösung.

Zum Nachweis sehr geringer Stärkemengen bringt man die Körner zum Quellen und färbt sie mit Jod bei möglichster Entfernung störender Zellinhalte. Es ist vorteilhaft, die Präparate zuvor mit Weingeist von Farbstoffen (Chlorophyll) zu befreien oder Weingeistmaterial zu verwenden. An entfärbtem Material lassen sich sehr kleine Stärkeeinschlüsse der Chlorophyllkörner mit Jodjodkalium nachweisen. Man legt die Präparate in eine Jodjodkaliumlösung (1 : 50), in der bei starker Vergrößerung selbst sehr kleine Körnchen schwarz hervortreten, dann erhitzt man und verfolgt das Erkalten der Präparate unter dem Mikroskop, wobei das Wiedererscheinen der schwarzen Färbung recht augenfällig wird und die Körner sich gut von dem nur gelb gefärbten plasmatischen Inhalte und dem gelbbräunlichen Stroma der Chlorophyllkörner abheben. Besser wirkt Jodchloral (Lit. S. 44, 1). Etwas konzentrierte Chloralhydratlösung (5 : 2) wird auf dem Objektträger mit einem Tropfen weingeistiger Jodlösung (1 : 10) gemischt und das Präparat eingetragen. Eine Entfernung des Chlorophylls ist nicht unbedingt nötig, zuweilen aber dienlich. Das Reagens hellt schnell auf, bringt die Stärke (und Chlorophyllkörner) zum Quellen (Wirkung des Chloralhydrats), so daß selbst die kleinsten Körnchen durch Jod gebläut scharf hervortreten. Erwärmen beschleunigt und verstärkt die Wirkung. Mit Hilfe dieses Verfahrens läßt sich die Verteilung der Stärke in größeren Organen (Blättern) oder ihre eventuelle Abwesenheit leicht zur Anschauung bringen (Jodmethode von Sachs, verbessert von A. Meyer). Die betreffenden Gewebestücke werden in Jodchloralhydrat aufgekocht.

Früher wurde das Verfahren von Boehm[2] benutzt, bei dem die Stärke durch verdünnte Kalilauge zur Quellung gebracht und mit Jod gefärbt wird. Da Alkali die Jodfärbung verhindert, so muß Jodjodkalium im Überschuß zugefügt

[1] G. Lagerheim, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1897, XIV.

[2] J. Boehm, Stärkeb. d. Kresse usw., Sitzgsb. Wien. Ak., 1874, LXIX.

werden oder man muß vor der Färbung das Alkali mit Wasser gut auswaschen, eventuell mit Essigsäure neutralisieren. Heinricher[1]) benutzt Javellesche Lauge. Die Präparate verbleiben 1—24 Stunden bis zur Zerstörung ihres übrigen Zellinhaltes in der Lauge, die zurückbleibende Stärke wird mit Jod gefärbt; unter Umständen ist vor der Färbung Kleisterbildung zu empfehlen. Da es aber Stärke gibt, die sich ziemlich leicht in der Lauge löst, besonders wenn nur Spuren zugegen sind, und man die Dauer der Einwirkung der Lauge für schwierige Fälle stets ausprobieren muß, so zieht man die anderen Verfahren vor.

Der Zusatz von Aufhellungsmitteln (Chloralhydrat) bei der Jodstärkereaktion ist auch in solchen Fällen notwendig, in denen Eiweißgebilde die Stärkekörnchen verdecken oder die Zellen große Mengen Eiweiß führen. Dann speichern die Eiweißkörper soviel Jod unter Braunfärbung, daß die Stärkereaktion verdeckt wird. Diese Bedingungen
sind bei Algen gegeben, auch Treboux[2]) weist bei Cystococcus humicola (Gonidie) hierauf hin.

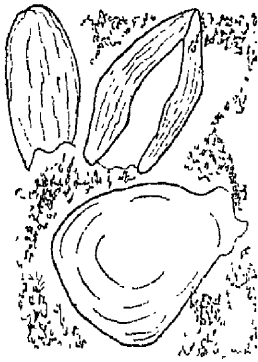



Fig. 169.
Hüllen der Stärkekörner

entleerte Stärkesubstanz, mit Jod blau (Tunmann)

Färbungen werden bei Stärkekörnern vielfach benutzt, teils zu wissenschaftlichen Zwecken, teils um verschiedene Stärken zu unterscheiden. Sie beruhen nach Salter (Lit. S. 776) auf Adsorption, denn die aufgenommenen Farben sind durch Auswaschen leicht zu entfernen, während Fischer der Meinung ist, daß Lösungsvorgänge und chemische Reaktionen stattfinden. Nach der Naegelischen Theorie beruht die Färbung auf dem Eindringen der Färbung in die Micellarinterstitien. Jedenfalls ist mit der Färbung ein deutlicheres Hervortreten der Schichten verbunden. Vorzüglich benutzt man Färbungen zu Studien über die Entwickelungsgeschichte des Stärkekornes und seine Beziehungen zum Plastiden. A. Meyer färbte mit Methylviolett. Beim Nachbehandeln der gefärbten Stärke mit einer stark verdünnten wässerigen Lösung von Kalziumnitrat schlägt sich der Farbstoff in den schwach lichtbrechenden, wenig dichten Schichten nieder. Vorteilhaft wird man Färbungen an Stärkekörnern der Kartoffel und von Canna indica studieren. Im allgemeinen sind (H. Fischer)[3]) zur Färbung geeignet wässerige Lösungen von: Fuchsin, Safranin, Chrysoidin, Jodgrün, Neutralrot, Gentianaviolett, Brillantgrün, Nilblau, Methylgrün, Thionin und

[1]) E. Heinricher, Verwendb. d. Eau de Javelle z. Nachw. kleinster Stärkemengen, Zeitschr. wiss. Mikr., 1886, III, S. 213.

[2]) O. Treboux, Cystococc. humic., Ber. deutsch. bot. Ges., 1912, XXX, S. 69.

[3]) H. Fischer, Über die kolloidale Natur d. Stärkekörner und ihr Verhalten gegen Farbstoffe, Bot. Centralbl., Beih., 1905, XVIII, S. 409.

Indulin (spirituslöslich). Indulin ist der einzige weingeistlösliche Farbstoff, der färbt. Die genannten Farben werden sehr schnell und sehr reichlich aufgenommen. Man läßt das Gemisch von Farbstoff und Stärke eintrocknen und behandelt mit Pikrinsäure. Dadurch werden die Farben als feiner Niederschlag fixiert. Andere Farben färben so wenig, daß sogar nach einigen Tagen die Körner sich nur wenig von der Farblösung abheben (Fuchsin S, Bismarckbraun, Hämatoxylin, Indigcarmin, Methylenblau u. a.). Selbst nach mehreren Wochen werden nicht aufgenommen: Carmin, Hessisch Purpur, Diamin-Echtrot; Kongorot, Anilinblau, Cyanin, Benzoschwarzblau, wasserlösliches Nigrosin.

Wenn die Stärke — durch Druck, erhöhte Temperatur, chemische Mittel — zu quellen beginnt, so adsorbiert sie Farbstoffe, die sie in ungequollenem Zustand nicht adsorbiert, so Eosin, Kongorot, Brillantblau, Wasserblau, Phenolrot und Azolithmin. Gleichzeitig verschwindet die Doppelbrechung[1]).

Farbstoffe können sich gegenüber Stärkekörnern verschiedener Pflanzen verschieden verhalten. Insbesondere färbt sich Kartoffelstärke meist leichter an, als die Gramineen-Stärken. Darauf beruhen mehrere Verfahren[2]) zum Nachweis von Kartoffelstärke neben Gramineen-Stärken. Es genügt ein einziges dieser Verfahren, das von Unna, anzugeben, zumal gerade dieses auch noch außerdem die Unterscheidung von Weizen- und Roggenstärke gestattet[3]).

Vorbereitung des Präparates: 5—10 g des zu untersuchenden Mehles werden in einem kleinen weithalsigen Fläschchen mit 3proz. Karbolwasser kurz aufgeschüttelt und 24 Stunden stehen gelassen. Hierauf streicht man eine kleine Menge des feuchten Mehles auf einen Objektträger und läßt ihn ¼—½ Stunde bis zur Lufttrockenheit liegen.

Notwendige Lösungen: I. Wasserblau 1,0, Orcein 1,0, Eisessig 5,0, Glyzerin 2,0, Weingeist 86proz. 50,0, Wasser zu 100 (bei Hollborn, Leipzig als Wasserblau-Orcein-Mischung).

II. Eine 1proz. Lösung von weingeistlöslichem Eosin in 60proz. Weingeist.

III. 1proz. Safraninlösung (Grübler).

IV. 0,5proz. Kaliumdichromatlösung.

Ausführung der Färbung:

---

[1]) H. Huß, Die Quellung der Stärkekörner, Arkiv för Bot., 1923, XVIII, S. 1 nach Bot. Zentralbl., 1924, IV, S. 65.

[2]) G. Blunck, Ein neues Färbeverfahren für Kartoffelstärke, Zeitschr. Untersuchg. Nahrgs.- u. Genußm., 1915, XXIX, S. 246; C. Posner, Studien zur Mikroskopie von Mehl und Brot, ebenda S. 239; W. Herter, Brotuntersuchungen mit dem Farbengemisch „Schwarz-Weiß-Rot", Zeitschr. f. d. ges. Getreidewesen, 1917, IX, S. 44.

[3]) E. Unna, Mikroskopisch-färberischer Nachweis von Weizen-, Roggen- und Kartoffelstärke nebeneinander, Zeitschr. Untersuchg. Nahrgs.- u. Genußm., 1918, XXXVI, S. 48.

ammon bei 32—33°, pH = 2,25) aus zahlreichen Kohlenstoffverbindungen in der Nährlösung lösliche Stärke[1]).

Amylodextrinstärke

Amylodextrin (Amylodextrinstärke, rote Stärke), von C. Naegeli 1858 (Stärkekörner S. 192) aufgefunden, hat die gleiche empirische Zusammensetzung wie Stärke, soll aber substanzärmer sein (A. Meyer, Ber. bot. Ges., 1886 und 1887, Y. Shimoyama, Diss. Straßb. 1886 u. a.). Ein Amylodextrin entsteht aus Stärke durch Einwirkung von verdünnten Säuren und Enzymen (Speichel, Diastase) und kristallisiert in Nadeln, Tafeln und Sphärokristallen (Naegeli). Sechsseitige Tafeln und Prismen von Amylodextrin hat Schardinger (Zentralbl. Bakt., 1908, $XXVII_2$, S. 98) aus verschiedenen Stärkesorten mit Hilfe des die Stärkesubstanz lösenden Bacillus macerans erhalten.

Fig. 170. .mylodextrinstärkekörner, *a*) aus dem Arillus von Myristica fragrans (Macis), *b*) aus Sorghum vul-

Amylodextrin kommt ganz überwiegend in Form kleiner rundlicher, zuweilen länglicher Körner vor (selten gelappt, Fig. 170). Hanausek[2]) gibt gelöstes Amylodextrin neben Körnern in Form einer farblosen, durchsichtigen Masse im inneren Endosperm des Zuckermais an. Amylodextrinkörner finden sich vielfach: Chelidonium maj., Arillus (Naegeli), Reisendosperm (Gris), Sorghumendosperm, Gentianablätter (A. Meyer, Dafert), Orchideenembryonen (Treub), Goodyera, Malaxis, Sweertia, Monotropa (Russow), Macis, keimende, stärkefreie Samen von Sinapis alba (Tschirch), Helianthemumsamen (Rosenberg), Lathraea cland. und squam. (Tracheiden, Heinricher, Lit. S. 150, 3), Isopyrumknollen (Mac Dougal), Rhinanthaceenhaustorien (Sperlich), Allium cepa, Wurzelhaube (Husek), Eleusine coracana (Mitlacher), Embryonen von Canna (Overhagen). Laubblätter von Iris germanica (A. Mayer), Embryosack von Podophyllum peltatum (Lublimerowna)[3]). Wo Stärke in Umwandlung begriffen ist, wird man auf Körner mit Amylodextrinreaktion fahnden können, vorzüglich dort, wo Stärke zur Bildung von Schleimmembranen verbraucht wird (Helianthemumsamen)[4]).

---

[1]) Boas, F., Jodbläuende stärke- und zelluloseähnliche Kohlenhydrate bei Schimmelpilzen als Folge der Wirkung freier Säure, Ber. deutsch. bot. Gesellsch., 1916, XXXIV, S. 786. — Stärkebildung bei Schimmelpilzen, Biochem. Zeitschr., 1917, LXXX,, S. 78 u. LXXXI, S. 80. — Die Bildung löslicher Stärke im elektiven Stickstoff-Stoffwechsel (Ber. deutsch. bot. Gesellsch., 1919, XXXVII, S. 50).

[2]) T. F. Hanausek, Mais-Stud., Arch. Chem. u. Mikr., 1911, IV, Sep.

[3]) Lublinerowna, K., Über die Plastiden in der Eizelle von Podophyllum peltatum (Arch. soc. Bot. Polon. II, 1925.

[4]) Vgl. A. Gris, Bull. soc. bot., 1860, VII, 876. — A. Meyer, Arch. d. Pharm., 1883 ,CCXX. — T. W. Dafert, Ber. d. bot. Ges., 1887, V, 108. — M.

Reines Amylodextrin färbt sich mit Jodreagentien rein rot. Der Ausfall der Jodreaktion hängt von dem Gehalt der Körner an Amylodextrin ab. Die Farben schwanken denn auch von violettrot bis rotbraun und braungelb. Jodalkohol färbt gelblich, Jodjodkalium rotbraun. Verschiedentlich beobachtet man Übergänge von blau bis rot. Die Blaufärbung zeigt noch reine Stärkesubstanz an und tritt oft in den inneren Partien des Kornes auf, so daß um einen blauen Kern eine mehr oder weniger rötliche Hülle sichtbar wird. Bei lange gelagertem Material, besonders bei alten Früchten und Samen, tritt die Reaktion erst dann typisch ein, wenn man das Material auf einige Zeit in Wasser eingelegt hat. Die Jodfärbung verschwindet beim Erwärmen, um beim Erkalten wieder hervorzutreten. Amylodextrinkörner quellen in Kalilauge, Chloralhydrat u. a., so daß man zum Nachweis sehr kleiner Körnchen, in gleicher Weise wie beim Amylumnachweis, Jodchloral benutzen kann. Man kann die Umwandlung der gewöhnlichen Stärke in Amylodextrin verfolgen, wenn man Stärkekörner längere Zeit in Speichel bei 50° beläßt. Die Körner färben sich mit Jod nach einigen Stunden nicht mehr blau, sondern violett bis weinrot, schließlich gelb.

Wenn wir von der Macis (Fig. 170a) und einigen anderen Objekten (s. oben) absehen, kommt dem Amylodextrin kein großer diagnostischer Wert zu, denn der Gehalt der Körner an Amylodextrin ist ungemein schwankend und zum Teil auch von dem Entwicklungsstadium der betreffenden Früchte und Samen abhängig. Eine Zusammenstellung der Pflanzen, in deren Wurzelhauben Amylodextrin gefunden wurde, findet sich bei Ziegenspeck, Bot. Arch., 1924, VII, S. 251.

Cryptomonaden- und Peridineen-Stärke

1. Cryptomonaden. Reservestoff, der im Cytoplasma abgelagert wird. Sehr klein, quellbar, mit Jod rotviolett.

2. Peridineen. Ausbildung der sehr kleinen Stärkekörnchen meist außerhalb der Chromatophoren.

Florideenstärke

Florideenstärke (Rhodophyceenstärke), schon von C. Naegeli 1858 und von van Tieghem (S. l. glob. amylacés d. Flor., Compt. rend., 1865, LXI, 804)

Treub, Embryogénie d. quelq. Orchidées, 1879, 22. — E. Russow, Dorpater Sitzgsber., 1884, VII. — A. Tschirch, Ber. d. bot. Ges., 1888, VI, 138. — O. Rosenberg, Stud. üb. Membranschleim, Veröff. Ak. Stockholm, 1898, Sep. — D. T. Mac Dougal, A contr. to phys. of root tubers of Isopyrum biternatum, Minnesota Bot. Stud. Bull., 1896, 501. — Sperlich, Inhaltsst. d. Saugorg. d. Rhinanth., Bot. Centralbl., Beih., 1902, XI, 437. — Hušek, Bot. Zentralbl., 1902, XC, 549. — W. Mitlacher, Exot. Gramineenfr., Zeitschr. öst. Ap. Ver., 1901, XLV, Nr. 34 und andere.

beschrieben, ist in chemischer Hinsicht wenig erforscht[1]). Sie steht dem Amylodextrin höherer Pflanzen nahe, vielleicht auch dem Glykogen. Florideenstärke kommt in 3—6 μ großen rundlichen, eiförmigen oder ovalen Körnchen vor (Fig. 171). Abweichende Formen beschreibt Hansen (Lit. S. 791, 1) bei Chondriopsis, Chondria u. Laurencia. Ihre Bildung im Cytoplasma wird von Fr. Schmitz (Chromat. d. Alg.), Schimper (Lit. S. 782, 1), Mangenot[2]) u. a. angenommen und in den Markzellen sind jedenfalls plastidenähnliche Gebilde mit Sicherheit nicht aufzufinden (Tunmann, Ap.-Ztg., 1909, XXIV, 151). Florideenstärke wird meist als Reservestoff aufgefaßt, darauf deutet auch ihr Vorkommen in den Sporen hin.

Im polarisierten Lichte verhält sich die Florideenstärke wie Amylum (bei gekreuzten Nicols ein orthogonales schwarzes Kreuz, van Tieghem). Mit Jodjodkaliumlösung[3]) wird sie gelbbraun bis braunrot, mit Chlor-

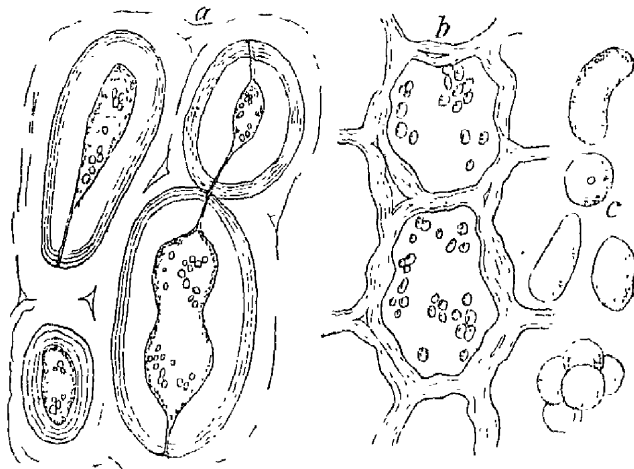



Fig. 171. Florideenstärke, a) Chondrus crispus, b) Alsidium spec. (Helminthochorton-Droge), c) einzelne Körner bei starker Vergrößerung (Tunmann)

zinkjod weinrot. Doch kommen nach Belzung[4]) bei einigen Florideen Körnchen vor, die sich mit Jod blau färben. Auch bei Helminthochorton (Droge) fand Tunmann wiederholt echte Stärke. Besonders jugendliche Körner weisen bisweilen Blaufärbung mit Jod auf. Die gelb- bis weinroten Farben wechseln in ihren Abtönungen sehr. Die Beschaffenheit des Materials (frisch oder getrocknet) scheint ebenfalls von Einfluß zu sein. Kolkwitz[5]) ließ Chloralhydrat einige Zeit einwirken und er-

[1]) O. Bütschli, Not. üb. sog. Florideenst., Nat.-med. Ver. Heidelberg, 1903, N. F. VII, S. 519.

[2]) G. Mangenot, Documents concernant l'amidon des algues Floridées, Compt. rend. soc. Biolog., 1921, LXXIII, S. 406.

[3]) Rosanoff, Observat. s. l. fonct. et l. propriétés des pigments d. div. alg., Extr. d. mém. Soc. imp. Cherbourg., XIII.

[4]) E. Belzung, Rech. morph. et physiol. s. l'amidon et les graines de chlorophylle, Ann. d. Bot., 1892, V, S. 179.

[5]) R. Kolkwitz, Beitr. z. Biol. d. Florideen, Helgol. wiss. Mitt., IV und: Ber. deutsch. bot. Ges., 1899, XVII, S. 247 (Gen. Vers. Heft).

hielt dann bei der Färbung mit Jodjodkalium zwei Farbentypen, den Laurenciatyp, der dem Kartoffeltyp nahesteht, und den Furcellariatyp, der mit dem Macistyp (mit der Jodfärbung des Amylodextrin der Macis) übereinstimmt. Die verschiedenen Farbentöne bei der Jodfärbung (Jod in Dampfform, in alkoholischer Lösung, als Jodjodkaliumlösung) wurden (auch makrochemisch) eingehend von Bütschli verfolgt. Da nun aber Farbentöne erfahrungsgemäß von den einzelnen Beobachtern selten übereinstimmend herausgefunden werden, so scheint hiermit kein greifbarer Erfolg gegeben zu sein, zumal vielfach Übergänge auftreten.

Die Jodfärbung führt man nach Kylin[1]) am besten so aus, daß man Schnitte oder Thallusteile in eine nicht zu schwache Lösung von Jodjodkalium legt, nach einigen Minuten in Wasser überführt und in Wasser beobachtet. Die Färbung ist dann violett, jedoch mit einem Stich ins Braunviolette, Rot- oder Blauviolette. Nach etwa ½stündigem Aufenthalt in Wasser sind die Körner wieder farblos (Kolkwitz).

In ihrem Verhalten gegen heißes Wasser, Kalilauge, Chloralhydrat stimmt die Florideenstärke mit der Stärke überein. Durch heißes Wasser wird sie verkleistert. Leicht überzeugt man sich hiervon, wenn man einen mit Jodjodkalium gefärbten Schnitt erwärmt. Die einzelnen Körnchen bilden dann einen mehr oder weniger homogenen „Kleisterballen". Die Ballen bestehen aber nicht aus reiner Florideenstärke, wie die pharmakognostische Literatur für Carrageen angibt, sondern aus dem gesamten Protoplasten, der von der Stärke durchtränkt wird. Da man bei Chondrus mit Chlorzinkjod auch bei Abwesenheit von Körnchen eine Färbung erhält, so wäre zu untersuchen, ob die Florideenstärke zuweilen nicht auch in gelöster Form auftritt. In Kalilauge, Chlorzinkjod[2]) und in Chloralhydrat quellen die Körnchen. Mit Hilfe des Quellungsvermögens lassen sich (wie beim Nachweis kleinster Amylummengen) selbst Spuren von Florideenstärke durch nachfolgenden Jodzusatz nachweisen, beispielsweise in den Rindenzellen. Man kann hierzu Jodchloralhydrat (S. 839) benutzen. Die Florideenstärke teilt mit dem Amylum die Eigenschaft, die durch Jodreagentien erzeugte Färbung beim Erhitzen abzugeben (farblos zu werden), um sie beim Erkalten sofort wieder anzunehmen. — Ein Befund Flückigers (Pharmakogn., 1881, S. 254) verdiente weitere Nachforschung. „Werden dünne Schnitte des Carrageen in geschlossener Röhre einen Tag lang mit alkoholischer Kalilauge im Wasserbade erwärmt und nach dem Abwaschen mit Jodlösung (1 Jod, 3 Jodkalium, 500 Wasser) einige Stun-

[1]) H. Kylin, Zur Biochemie der Meeresalgen, Zeitschr. physiol. Chem., 1913, LXXXIII, S. 171.

[2]) E. Bruns, Inhaltskörp. d. Meeresalg., Flora, 1894, LXXIX, S. 159.

den in Berührung gelassen, so färbt sich der gesamte Zellinhalt, nicht die Wandungen, aufs tiefste blau".

Die Florideenstärke mit ihren charakteristischen Reaktionen ist ein vorzügliches Mittel, um das feinste Pulver von Agar-Agar oder von Carrageen mikroskopisch nachzuweisen (im Agar-Agar finden sich stets Zellkomplexe der verarbeiteten Algen, Tunmann, Bemerk. üb. Agar-Agar, Ph. Zentralb., 1909, L, 223).

Wenig erforschte Bestandteile der Phaeophyceen

Im Cytoplasma der Phaeophyceen kommen kleine (0,5—4 μ) Gebilde vor, über deren Natur trotz vielfacher Untersuchungen die Ansichten geteilt sind. Eine Literaturübersicht erscheint notwendig. Schmitz[1]) erwähnt in Wasser unlösliche Körnchen, die ein stärkeres Lichtbrechungsvermögen als der übrige Zellinhalt besitzen, und „mattglänzende hyaline Tröpfchen". Diese Bildungen (Fig. 172) reagieren nicht mit Jod, doch ist Schmitz geneigt, sie für Kohlenhydrate anzusprechen; sie werden als Phaeophyceenstärke (auch von Schimper) bezeichnet. Hansen (Lit. S. 791, 1) spricht diese (und wohl auch ähnliche) Bildungen, die in Wasser unlöslich sind und in Glyzerin zusammenfließen, für Fett an; sie werden durch Kalilauge schaumig und lösen sich in 90proz. Weingeist und in Äther. Crato[2]) erhielt mit Vanillinsalzsäure und mit Piperonalschwefelsäure (je 1 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure und weingeistige Piperonallösung) Rotfärbung und nimmt phenolartige Substanzen an (Phloroglucin), stellt aber eine eiweißartige Natur in Abrede. Er unterscheidet an den Bildungen eine Plasmahaut, die durch Reagentien gehärtet wird, sowie einen mit Wasser, Äther, Essigsäure, verdünnter Salzsäure und Kalilauge mischbaren Inhalt, der mit Anilinsulfat und Kaliumnitrit gelb, dann rot, mit Kaliumnitrit und Schwefelsäure braungelb wird. Die Bildungen sollen amöboid beweglich sein (Physoden)[3]).

Fig. 172. Laminaria spec., Zelle mit Chromatophoren und kleinen diesen zum Teil auf- und anliegenden Physoden (Tunmann)

[1]) Fr. Schmitz, Beitr. z. Kenntn. d. Chromatoph., Jahrb. f. wiss. Bot., 1884, XV, S. 1.

[2]) E. Crato, Morph. u. mikrochem. Unters. üb. d. Physoden, Bot. Ztg., 1893, LI, S. 157 u.: Üb. d. Hansteenschen Fukosankörner, Ber. deutsch. bot. Ges., 1893, XI, S. 235.

[3]) Über die Verteilung der Physoden in den Zellen der Phaeophyceen, s. M. Chadefaud, Bull. soc. bot. France, 1930, LXXIVI, S. 15.

Weiteres über das Wesen der Physoden s. in der von Defer, Mangenot u. Dangeard geführten Auseinandersetzung (Bull. soc. bot. France, 1930, LXXVII, H. 5 u. 6).

Nach Mangenot[1]) sind die Fukosankörner nichts für die Phaeophyceen Charakteristisches, sondern sind den vakuolären Niederschlägen anderer Pflanzen analog, wie sie als Körnchen in den Vakuolen entstehen, z. B. den Cyanoplasten. Fukosan kann auch in flüssigem Zustand auftreten.

Demgegenüber beharrt Dangeard (s. oben) bei der Ansicht, daß es sich bei den Physoden nicht um vakuoläre Niederschläge, sondern um Gerbstoffblasen handelt.

Manche Autoren halten die Bildungen für Kohlenhydrate, so Clautriau[2]) (bei Himanthalia lorea) und besonders Hansteen[3]). Letzterer hält sie für stärkeähnliche Gebilde (Fukosan)[4]), die von den Chromatophoren in flüssigem Zustande ausgeschieden werden, im Cytoplasma aber erst zur vollen Größe gelangen und rundliche Formen annehmen. Sie färben sich mit sehr verdünntem Methylviolett. Pylaiella littoralis wurde 16 Stunden im Dunkeln in größerer Menge Seewasser gehalten, dem 0,0005% Methylviolett zugefügt war. Nach Hansteen soll Fukosan ein linksdrehendes, nicht direkt gärungsfähiges Kohlenhydrat sein, dessen Bildung vom Licht abhängig ist. Ihm schließt sich im allgemeinen Hunger[5]) an, trotzdem er mit 1proz. Osmiumsäure in Meerwasser Schwärzung feststellt. A. Meyer erhielt bei Laminaria Volutinreaktion (S. 679). Berthold spricht die Gebilde für „Tropfen einer Gerbstofflösung" an, Koch[6]) verneint einen Phloroglucingehalt.

Man kann die sog. Fucosankörner oder Physoden der Phaeophyceen allgemein vital mit Neutralrot und Kresolblau färben, in manchen Fällen, so in Pilaiella littoralis Kjellm. auch durch Janus-Grün B.

[1]) G. Mangenot, Sur les „grains de fucosane" des Phéophycées, Compt. rend. Acad. sciences, Paris 1921, CLXXII, S. 126.

[2]) G. Clautriau, Les réserves hydrocarbonées des Thallophytes, Miscell. bot. dédiées au Prof. Giard, Paris 1899, S. 114.

[3]) B. Hansteen, Üb. d. Fukosan, als erstes scheinbares Produkt der Kohlensäureassimilation bei den Fucoideen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, XXXV, S. 611.

[4]) Sauvageau betrachtet die Schleimdrüsen von Undaria und Alaria esculenta als Fucosan-Reservoir. — C. Sauvageau, Sur les „glandes à mucilage" de certaines Laminaires, Compt. rend. Acad. sciences, Paris 1916, CLXII, S. 921.

[5]) F. W. T. Hunger, Üb. d. Assimilationsprod. d. Dictyotaceen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1903, XXXVIII, S. 70.

[6]) L. Koch, Unters. üb. d. bisher für Öl oder Phoroglucin gehalt. Inhaltsk. d. Fucoideen, Diss. Rostock, 1896.

Die in diesem Fall zu beobachtenden Erscheinungen zeigen, daß die Physoden Bläschen mit flüssigem Inhalt sein können[1]).

Die Physoden können auch nach Cajal mit Silber imprägniert werden.

Befunde von Tunmann[2]) und seine Nachprüfungen führten zu nachstehendem Ergebnis. Den bläschenartigen Gebilden fehlt (entgegen Crato und in Übereinstimmung mit Hansteen) eine Eigenbewegung. Sie sind nur an lebendem und gut fixiertem Material zu studieren. An getrocknetem Material sind sie meist nicht mehr sichtbar, da sie dann andere Inhalte, besonders die Chromatophoren, imprägnieren, so daß diese mit Vanillinsalzsäure reagieren. Die Rötung mit diesem Reagens ist auch von Bruns (Lit. S. 847, 2) angegeben worden. Sie tritt mit voller Schärfe zuweilen erst nach einiger Zeit ein. Die Vanillinsalzsäurereaktion ist aber hier in erster Linie eine Eiweißreaktion. Fixiert man lebendes Material mit Azeton-Meerwasser oder mit technischem Azeton, dann lassen sich Eiweißreaktionen (Jodreagentien) feststellen. Hierfür sprechen auch die Befunde von Crato, denn dieser betont, daß die Reaktionen mit Vanillinsalzsäure, rauchender Salpetersäure, Millon und Zucker-Schwefelsäure in gleicher Weise bei allen untersuchten Fucoideen eintreten, daß aber „gegen andere Reagentien, wie Osmiumsäure, Ferrosulfat, Ferrichlorid, Kaliumdichromat sich die Physoden der einzelnen Arten verschieden" verhalten (Bot. Ztg., 1893, S. 190). Aus Phloroglucin (Crato) kann der Bläscheninhalt deshalb nicht bestehen, da dieses mit Ferrichlorid blau wird, während die Bläschen sich nur schwach gelbbraun damit färben.

Des weiteren enthalten die Bläschen wechselnde Mengen an Gerbstoff, denn die Gerbstoffreaktionen fallen sehr schwankend aus. Die Färbung mit Methylviolett ist in erster Linie eine „Lebendfärbung". Kohlenhydrate sind nicht zugegen. Die bis jetzt für die Gegenwart von Fukosan beigebrachten Befunde (auch die makrochemischen) sind nicht genügend und fußen wohl hauptsächlich darauf, daß die Bläschen aus den Chromatophoren hervorgehen. Sollen aber nur Kohlenhydrate aus den Chromatophoren hervorgehen (vgl. S. 631)? Ein Zusammenhang mit der Assimilation scheint allerdings nach den Verdunkelungsversuchen Hansteens zu bestehen.

Es ist angebracht, diese Bildungen bis zur endgültigen Erforschung kurz als Phaeophycin zu bezeichnen.

[1]) M. Chadefaud, Les physodes des Phéophycées, leur coloration vitale et leur structure, Bull. soc. bot. France, 1929, LXXVI, S. 777.

[2]) O. Tunmann, Z. Kenntn. d. Laminaria, Pharm. Zentralh., 1907, XLVIII, S. 241 u. Lit. S. 150, 4.

Kylin[1]), der anscheinend diese Ausführungen Tunmanns nicht kennt, behält in seiner letzten Arbeit über diesen Gegenstand den Namen Fukosan für denjenigen Inhaltsstoff der Blasen bei, der folgende Reaktionen gibt: Rotfärbung mit Vanillin-Salzsäure, Schwarzfärbung mit Osmiumsäure, Aufspeicherung von Methylenblau und Methylviolett. Obwohl Fukosan mit Ferrichlorid nicht wie ein Gerbstoff reagiert, hält es Kylin auf Grund folgender Reaktionen für einen gerbstoffähnlichen Stoff. Seine Lösung reduziert Silbernitrat zu metallischem Silber, Ferrisalze zu Ferrosalzen, Kuprisalze zu Kuprosalzen, es wird durch Bleiazetat (vollständig durch Bleiessig) gefällt, ebenso durch Leim; die Lösung schmeckt adstringierend. Durch Oxydation geht es in ein braunes bis rotbraunes Oxydationsprodukt, das Phycophaein, über.

Diese Eigenschaften weisen zweifellos auf ein Polyphenol hin und Crato, der diesen Stoff für Phlorogluzin oder einen verwandten Stoff hielt, dürfte wohl der Wahrheit am nächsten kommen.

Bemerkenswert ist noch, daß nach Chadefaud (Le Botaniste, 1927, XVIII, S. 155) die Physoden alter Zellen von Sphacelaria mit Vanillin-Salzsäure eine grünblaue Färbung geben.

Nicht mit dem Fukosan identisch sind die an den Chromatophoren entstehenden körnchenartigen Gebilde (Phaeophyceenstärke nach Schmitz, Pyrenoide nach Kuckuck). Sie bestehen nach Kylin wahrscheinlich aus eiweißartigen Stoffen. Näheres darüber s. S. 848.

In den Assimilationszellen der Dictyotaceen finden sich sehr kleine lichtbrechende Gebilde auf der ins Zelllumen ragenden Oberfläche der Chromatophoren und etwas größere Körper im Zelllumen. In den Speicherzellen treten außerdem noch größere stark lichtbrechende Kugeln auf. Letztere sollen die Fluoreszenz der Algen bedingen und Reservestoffe darstellen. Die kleinen Gebilde, „Inhaltskörper", sollen sich nur „bei Anwesenheit der Phaeoplasten und im Lichte entwickeln" (Hunger, Lit. S. 849, 5) und bei längerer Verdunkelung verschwinden. Zur Untersuchung müssen lebende, dem Meerwasser frisch entnommene Algen benutzt werden. Hansen (Lit. S. 791, 1) hielt Inhaltskörper und Kugeln für Fett, da sie sich in 1proz. Osmiumsäure-Meerwasser schwärzen. Die Osmiumreaktion bleibt jedoch aus, wenn ganze Thallusstücke in Chloralhydrat, Eisessig oder Chromsäure einige Zeit gelegen haben. Die Inhaltskörper röten sich ferner mit Vanillinsalzsäure (aber nur bei Material aus den Monaten Januar und Februar, Hunger). Die den Chromatophoren anhaftenden Gebilde reagieren weder mit Osmium noch mit Vanillinsalzsäure. Die Inhaltskörper sind in Äther,

[1]) H. Kylin, Über die Fukosanblasen der Phaeophyceen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1918, XXXVI, S. 10; Untersuchungen über die Biochemie der Meeresalgen, Zeitschr. physiol. Chem., 1915, XCIV, S. 402; Zur Biochemie der Meeresalgen, Zeitschr. physiol. Chem., 1913, LXXXIII, S. 171.

Chloroform, Schwefelkohlenstoff und Benzol unlöslich und sollen sich nach Hunger in Wasser lösen (nach Hansen sind sie nicht wasserlöslich); sie färben sich mit Kaliumdichromat und speichern Methylenblau (1 : 500000). Bei Behandlung ganzer Pflanzen mit Ptyalin und alkalischer Trypsinlösung werden die den Chromatophoren anhaftenden Gebilde angegriffen, Myrosin wirkt auf die Inhaltskörper im Zelllumen ein, Pepsin auf die Kugeln. Die Inhaltskörper sind komplizierter Zusammensetzung, nach Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure wird die Fehlingsche Lösung reduziert. Die großen Kugeln enthalten Fett.

Laminarin ist nach Kylin ein Gemisch verwandter Kohlenhydrate, das während des Sommers gebildet und während des Winters zum Zuwachs und zur Fortpflanzung verbraucht wird.

Nach Colin und Ricard[1]), die es nur in den Fucus-Arten und Ascophyllum nodosum fanden, kommt es im Sommer nicht in allen Braunalgen vor.

Die Physoden der Confervaceen

In den vegetativen Zellen und den Zoosporen der Confervaceen finden sich Physoden, die eine weitgehende Analogie mit denen der Phaeophyceen (s. S. 848) zeigen. Nach Chadefaud[2]) sind es Tannidkugeln, in die Sekrete des Stoffwechsels abgeladen werden; vielleicht sind sie auch Reserveorgane.

Sie färben sich leicht vital mit mehreren Farbstoffen, so purpurrot mit Neutralrot, türkisblau mit Kresol- und Metylenblau, violett mit Dahlia-Violett. Sie bräunen sich durch Osmiumsäure-Dämpfe und färben sich in der Indophenolblau-Reaktion langsam blau.

Die Physoden geben Tannid-Reaktionen. Sie werden durch Kaliumdichromat gelbbraun, mit Ferrichlorid braun, mit Kupferazetat (Bendas Reagens) gelb. Jodjodkalium bräunt leicht. Vanillin-Salzsäure bewirkt grünblaue Färbung.

Die Physoden der Confervaceen lassen sich ferner nach dem Verfahren von Cajal mit Silber imprägnieren. Behandlung der lebenden Fäden mit Methylenblau und nachfolgend mit 1proz. Schwefelsäure (Verfahren von A. Meyer) färbt die Physoden violett, polychromes Blau und Kresolblau nach Fixierung mit Formalin oder Sublimat und Differenzierung mit Glyzerinäther oder sehr verdünnter Essig-

[1]) H. Colin u. P. Ricard, Glucides et dérivés glucidiques des Algues brunes, Compt. rend. Acad. sciences, Paris, 1930, CXC, S. 1514.

[2]) M. Chadefaud, Observations cytologiques sur les Confervacées, Bull. soc. bot. France 1930, LXXVII, S. 358.

säure blau. Hämateïn bewirkt nach Fixierung mit Formalin schwach und unregelmäßig braunviolette Färbuog. Die Färbung mit polychromem Blau tritt nach Vorbehandlung mit Dichromat-Mischungen nicht mehr ein.

Die Bestandteile der Cyanophyceenzelle

Im Zellinhalte der Cyanophyceen unterscheidet man verschiedene Gebilde, deren Natur noch strittig ist. Der Inhalt gliedert sich in einen gefärbten peripheren Teil, die sog. grüne Rinde, und in einen farblosen inneren Teil, den farblosen Zentralkörper. Rinde und Zentralkörper enthalten Einschlüsse, über deren Natur die Ansichten ebenfalls geteilt sind. Die Einschlüsse der Rinde heißen Cyanophycinkörner, die des Zentralkörpers Zentralkörner.

Der farblose **Zentralkörper** wurde von Hegler und Kohl (l. c.) als Kern angesprochen (Kernwand und Nukleolus fehlen). Sie gründeten ihre Anschauung auf mitosenähnliche Gebilde (Fixierungsmittel: Jodalkohol, Pikrinschwefelsäure, 10proz. Formaldehyd, 1proz. Osmiumsäure, Flemming, konzentrierte weingeistige Sublimatlösung). Nach Kohl soll sich der Zentralkörper mit Eau de Javelle isolieren lassen. Die mitosenähnlichen Gebilde nennt A. Fischer Pseudomitosen; sie treten auch an lebendem Material (Oscillaria tenuis, Anabaena, Symploca) ohne weiteres als weiße glänzende Massen hervor, die sich nicht mit Jod färben und in Wasser unlösliche Kohlenhydrate darstellen (Kohlenhydratmitosen). Nach A. Fischer ist der Zentralkörper ein mit Reservestoffen erfülltes Zentralplasma und ähnlich urteilt A. Meyer, der ihn für eine große mit zähflüssigem Eiweiß angefüllte Reservestoffvakuole hält. Nach den übereinstimmenden Befunden von A. Fischer, Olive, Phillips, Guilliermond[1]) und Gardner[2]) besitzt der Zentralkörper keine abgrenzende Membran. Doch sollen zuweilen feine Fortsätze strahlenartig die grüne Rinde (Fischers Chromatophor) durchsetzen und mit dem feinen protoplasmatischen Wandbelag in Verbindung stehen.

Zentralkörner sind kleine Gebilde des Zentralkörpers (teils kleine kuglige Gebilde, teils Pseudomitosen). Für eine Chromatinnatur dieser Bildungen treten ein: Guilliermond, Nadson, Olive, Phillips (unlöslich in künstlichem Magensaft), auch Zacharias („Zentralsubstanz", in verdünnter Salzsäure scharf umschrieben und glänzend wie Nuklein des Lachsspermas, S. 676). A. Meyer (Lit. S. 680, 3) tritt

[1]) A. Guilliermond, Contribution á l'étude cytologique des Cyanophycées, Revue générale de Botanique, 1906, XVIII.

[2]) Gardner, Cytological Studies in Cyanophyceae, Univers. of California publications, Botany 1906, II.

für Volutin ein. Bütschli (Lit. S. 680, 1) hebt die Färbbarkeit mit roten Farbstoffen hervor („rote Körner"), Palla und Hegler bezeichnen sie als Schleimkugeln. Nach Kohl und Hegler lassen sie sich mit Weingeist, Jodweingeist, 4proz. Formaldehyd, Sublimat, Pikrinsäure, Pikrinschwefelsäure, Flemming und Hermann fixieren, nach Kohl sind sie resistent gegen Eau de Javelle und Ameisensäure und werden mit Molybdänschwefelsäure (Ammonmolybdän 0,5, Wasser 1 ccm, Schwefelsäure 10 ccm) blau. Nach A. Fischer (Lit. S. 309, 1) reagieren sie nicht mit Jodreagentien; sie sollen aus Anabaenin bestehen[1]).

Anabaenin entsteht aus dem im Chromatophor der Cyanophyceen gebildeten Glykogen[2]) (S. 309 ob.) im Zentralkörper und bildet dort die Zentralkörner (kleine, kuglige Gebilde) und Pseudomitosen (chromosomenähnliche Knäuel und Körperchen). Es ist ein den Cyanophyceen spezifisches Kohlenhydrat, farblos, stark glänzend, unlöslich in kaltem und kochendem Wasser, in Kochsalz, konzentriertem Magnesiumsulfat, 20proz. Kupfersulfat und anderen Salzlösungen, in konzentriertem Ammoniak und konzentrierter Essigsäure, in Weingeist, Äther, Xylol, Toluol, Chloroform, unverdaulich in künstlichem Magensaft, farblos quellbar in Kupferoxydammoniak, unlöslich in stark verdünnten Mineralsäuren, sofort löslich in konzentrierter, langsam löslich in 5proz. Kalilauge. Anabaenin färbt sich nicht mit Jod- und Carminlösung, färbt sich schwach, doch nicht chromatinähnlich, mit Safranin, Gentiana, Jod- und Methylgrün, mittelstark mit Delafieldschem Hämatoxylin, gut mit Methylenblau, stark mit Eisenalaunhämatoxylin. Durch Behandlung mit heißen 1proz. Mineralsäuren oder mit 5proz. Oxalsäure, Jodjodkalium, Chlorzinkjod wird Anabaenin partiell in Glykogen zurückverwandelt. Es ist optisch anisotrop und veranlaßt das Bild der sog. Gasvakuolen.

In Anabaena und Oscillaria fand A. Fischer ein Enzym, welches wahrscheinlich auch in anderen Cyanophyceen vorkommt. **Anabaenase** löst innerhalb 10—15 Minuten das Kohlenhydrat Anabaenin. Es entsteht ein durch Jod weder färbbarer noch fällbarer Körper (Zucker). Anabaenase ist unempfindlich gegen Kochsalz- und Sodalösung, empfindlich gegen starke Magnesiumsulfatlösung, 5proz. Monokaliumphosphat-Lösung, 10proz. Kalisalpeter-Lösung und wird

[1]) Hierzu: Phillips, Comparative Study of the Cytol. a. Movem. of Cyanophyc., Trans. Bot. Soc., Pennsylvania, 1904, I, 237. — E. Zacharias, Über d. Cyanophyc., Abh. Hamb. Nat. Ver., 1900, XVI, 50. — F. G. Kohl, Organ. u. Phys. d. Cyanophyceenzelle, Jena, 1903. — R. Hegler, Unt. üb. d. Organ. d. Phykochromaceenzelle, Jahrb. f. wiss. Bot., 1901, XXXVI, 229. — E. Palla, Beitr. z. K. d. Baues d. Cyan.-Protoplasten, Jahrb. f. wiss. Bot., 1893, XXV, 511.

[2]) Glykogen wurde 1882 von Errera in Phykochromaceen aufgefunden.

vernichtet durch 10 Minuten langes Erwärmen auf 90°, durch 0,1proz. Lösungen von Formaldehyd, Essigsäure, Milchsäure, Karbolsäure, durch 0,3proz. Salzsäure und durch längere Berührung mit 5proz. und 10proz. Weingeist.

Als **Cyanophycinkörner** (Hieronymus)[1]) bezeichnet man kleine, im peripheren, gefärbten Teil liegende, kuglige Gebilde, die Schmitz Schleimkugeln (Lit. S. 805), Nadson Reservekörner, Zacharias Körner, Bütschli farblose Körner nennt, Phillips als Kohlenhydrate (löslich in 4proz. Salzsäure, 1proz. Schwefelsäure, Chloralhydrate, färbbar mit Hämatoxylin) und Hegler und Arthur Meyer als Eiweißkristalloide betrachten. Nach Hegler verschwinden sie in Dunkelkulturen, treten bei Belichtung wieder auf, nach Fischer dienen sie wahrscheinlich zur Erneuerung des Phykocyans, nach Kohl finden sie sich weniger in lebhaft wachsenden Pflanzen. Für die Eiweißnatur werden angeführt: Reichl-Mikoschsche Reaktion (S. 670), die „Quellbarkeit und das intensive Speicherungsvermögen für Jod und Farbstoffe wie Carmin, Säurefuchsin, Safranin, Orange G., Eosin". Sie färben sich mit Pikrocarmin (Macallum), nach Alkoholbehandlung mit Essig- und Alauncarmin (Zacharias). Lebendfärbung mit Methylenblau gelingt nicht (Palla). Von den Angaben von Zacharias sei nur erwähnt, daß Millon, Jodglyzerin und Chlorzinkjod farblos lassen sollen. Hingegen färbt Jodjodkalium nach Vorbehandlung mit verdünnter Schwefelsäure (1 : 100) braun und nicht, wie Borzi angab, blau[1]).

Guilliermond (1916) unterscheidet zwei Arten von Cyanophycinkörnern: kleine an den Querwänden gelagerte und größere, im übrigen Chromatoplasma verteilte.

Die metachromatischen Körperchen sind nach demselben Autor Fällungsprodukte.

Nach Guilliermond[2]) enthält ferner die Cyanophyceenzelle sehr kleine von Metachromatin erfüllte Vakuolen, die im Cytoplasma und nicht im Zentralkörper (Kern) lokalisiert sind. Nachweis durch Lebendfärbung mit Neutralrot, Methylen-, Kresyl- und Nilblau.

[1]) Vgl. hierzu: G. Nadson, Bau d. Cyan.-Protoplasten, Bot. Zentralbl., 1895, LXIII, 238. — E. Zacharias, Üb. d. Cyanoph., Jahrb. Hamb. wiss. Anst., 1904, 47. — H. Zukal, Bau d. Cyan. u. Bakt., Ber. d. bot. Ges., 1896, XIV, 331. — A. Borzi, Note alla morph. e biol. delle alghi ficocromacee, Estr. d. Nuovo Giorn., Bot. Ital., X. — G. Hieronymus, Cohns Beitr. z. Biol. d. Pflanzen, 1890, V, S. 351.

[2]) A. Guilliermond, Nouvelles observations sur la structure des Cyanophycées, Compt. rend. Acad. sciences, 1925, CLXXX, S. 951. — Derselbe, A propos de la structure des Cyanophycées, Compt. rend. soc. biol., 1925, XCIII, S. 1504; Ref. in Zeitschr. wiss. Mikr., 1926, XLIII, S. 450.

Auf Grund eingehender Untersuchungen kam Baumgärtel[1]) zu Anschauungen über die Bestandteile der Cyanophyceenzelle, die z. T. von denen seiner Vorgänger abweichen. Die von ihm entwickelten Anschauungen sind die folgenden: Der Protoplast der Cyanophyceen besteht aus dem peripheren Chromatoplasma mit Chlorophyll, Phykocyan und Carotin in diffuser Verteilung, auch winzigen Anhäufungen in Form Meyerscher Granula und dem hyalinen Centroplasma.

Das Centroplasma mit seinem Plastenapparate (Endo-, Epi- und Ektoplasten) stellt einen offenen Zellkern dar, welcher mit den eigentlichen Kernfunktionen noch die Rolle von Kohlenhydratplasten vereinigt.

Die Endoplasten, Gebilde von „liquider" bis steifgeliger Konsistenz, die wahrscheinlich ein Gemisch von Glyko- und Phosphorproteiden sind, sind die Füllsubstanz des Centroplasmas.

Die Epiplasten entstehen aus der Peripherie der Endoplasten. Sie bestehen aus einer sehr resistenten Hülle von hochkondensierten Nukleoglykoproteiden und einem mehr Proteincharakter aufweisenden weniger resistenten Kern. Sie sind identisch mit Bütschlis roten Körnern und Kohls Zentralkörnern.

Die an der Peripherie des gesamten Centroplasmas gebildeten Ektoplasten bestehen vorwiegend aus Proteinsubstanzen. Sie sind identisch mit Bütschlis farblosen Körnern, Zacharias „Körnern", den Cyanophycinkörnern von Palla, Zukal und Massert u. a. und den Reservekörnern von Nadson.

Gegen die Ansichten Baumgärtels wenden sich Poljansky und Petruschewsky. Sie verwendeten zur Untersuchung der zunächst mindestens 24 Stunden in 96proz. Weingeist gehaltenen Cyanophyceen die Feulgensche Nuklealreaktion (vgl. S. 756) (Hydrolyse mit Salzsäure 8—10 Minuten bei 60°, Behandlung mit fuchsinschwefliger Säure 3—5 Stunden; Abspülung in drei Portionen SO_2-haltigem Wasser), nachdem das Material durch Sublimat mit Essigsäure 100 : 5 (15 Minuten) oder reines Sublimat (20—30 Minuten) oder Schaudinns Flüssigkeit (15—20 Minuten) fixiert war. Zur Kontrolle wurde noch außer der üblichen cytologischen Technik die Mac Callumsche Reaktion auf Phosphorsäure in folgender Weise angewandt:

Fixierung mit Sublimat, Sublimat-Essigsäure oder absolutem Alkohol. Einbetten in Paraffin, Schneiden. 6 Stunden in absolutem Alkohol, nicht weniger als 24 Stunden in Äther. Dann Salpetersäure-Molybdat bei 35° während 24 Stunden oder bei 60° während 30 Minuten, rasches Abspülen mit destilliertem Wasser, 2proz. Phenylhydrazinhydrochlorid bei 35—40° binnen 2—3 Minuten, Abspülen mit Wasser (15—20 Minuten), Glyzerin oder Balsam.

[1]) O. Baumgärtel, Das Problem der Cyanophyceenzelle, Arch. f. Protistenkunde, 1920, XLI, S. 50.

Die Ergebnisse von Poljansky und Petruschewsky[1]) sind die folgenden:

Das Anabaenin Fischers, die die Nuklealreaktion ergebende (chromatische) Substanz und die Metachromatinkörperchen existieren gleichzeitig.

Der die Nuklealreaktion gebende Stoff des Zentralkörpers der Cyanophyceen tritt in verschiedenen morphologischen Formen auf. Die Komponente des Zellkerns, welche seit Flemming Chromatin genannt wird, besteht in bedeutendem Maaße aus *Nukleoproteiden*.

Während die chromatische Substanz ein notwendiger Bestandteil jeder lebendigen Zelle ist, können die Metachromatinkörperchen fehlen.

Die Metachromatinkörperchen sind hauptsächlich im Zentralkörper oder in seiner Nähe und besitzen stets regelmäßige Kugelform. Die kleineren Metachromatinkörperchen scheinen ausschließlich aus Volutin zu bestehen.

Der Zentralkörper enthält die Metachromatinkörperchen und die chromatische Substanz. Er ist kein Kern, sondern oft mit dem Cytoplasma zu vergleichen.

Das periphere Plasma ist kein abgegrenztes Chromatophor, sondern ein mit dem Farbstoff diffus durchtränktes Protoplasma.

Die Cyanophycinkörner sind Einschlüsse des peripheren Plasmas.

Die „roten Körner“ Bütschlis und die Chromatinkörner Nadsons = Metachromatinkörperchen.

Die Chromosomen Kohls sind Vorsprünge, Leisten u. dgl. der Zentralkörper (Zacharias), die von Olive (1906) teils größere Teilchen der chromatischen Substanz, teils Metachromatinkörperchen. Das „Reseau chromatique“ Guilliermonds = chromatische Substanz. Letzterer scheinen auch die Endoplasten Baumgärtels zu entsprechen, die Epiplasten = Metachromatinkörperchen.

Der Farbstoff[2]) der Cyanophyceen (s. auch S. 794) ist auf die peripheren Partien (sog. grüne Rinde) beschränkt. Nach Palla, Hegler und Kohl besteht die Rinde aus Cytoplasma, in dem winzig kleine Chromatophoren eingebettet sind. A. Fischer (und auch Olive)[3]) nimmt einheitliche Chromatophoren an, deren Stroma die Gestalt eines geschlossenen Hohlzylinders besitzt. Die kleinen Einlagerungen sollen Grana sein. Mit Flußsäure lassen sich die **Chromatophoren** isolieren (auch bei Conjugaten, Diatomeen, Moosen, Triticum u. a.).

---

[1]) G. Poljansky u. G. Petruschewsky, Zur Frage über die Struktur der Cyanophyceen-Zelle, Arch. f. Protistenkunde, 1929, LXVII, S. 11.

[2]) Vgl. dazu A. N. Danilow, Hydrochrome der Cyanophyceen und Florideen. Nachr. aus d. bot. Hauptgarten Petersburg, 1922, XXI, S. 2; Ref. in Bot. Zentralbl., 1924, IV, S. 215.

Nach Kylin (Zeitschr. physiol. Chem., 1927, CLXVI, S. 39, kommen in der Cyanophycee Calothrix scopulorum zwei Membranfarbstoffe vor: Fuscorhodin und Fuscochlorin.

[3]) E. W. Olive, Mitiotic division of the nuclei of the Cyanophyceae, Beih. Bot. Centralbl., 1904, XVIII, Heft 1.

Das protoplasmatische Stroma der Chromatophoren wird durch das Chlorophyll gegen die Einwirkung der Flußsäure geschützt. Wahrscheinlich bildet das Chlorophyll, das eine in Flußsäure unlösliche Substanz ist, bei der Ätzung einen ähnlichen Schutz für die Chromatophoren, wie ein Wachsüberzug für Glas. Auch ein extrahiertes Rohchlorophyll und Lezithin bewirken einen Ätzschutz. Die zu untersuchenden Algen werden mit Fließpapier abgetupft, in einen mit 30—40proz. Flußsäure (Mercksche Flußsäure ist 55proz.) beschickten Platintiegel gebracht, der Deckel wird aufgelegt und mit dem Bunsenbrenner vorsichtig erwärmt, bis 3—4 kurze Aufstöße der Flüssigkeit hörbar werden. Nun wird das Material mit Platindraht herausgenommen und in einer großen Schale mit ruhigem Wasser gut ausgewaschen (bis 24 Stunden). Die Algenfäden bleiben ganz, da die Zellulose nicht zerstört wird, das Plasma ist gelöst. Behandlung mit kalter Flußsäure (10—30 Minuten) ist weniger vorteilhaft, da nicht alles Plasma gelöst wird. Die Chromatophoren können gefärbt werden. Zur Färbung dienen am besten Lichtgrün, Säurefuchsin, Gentianaviolett in 1—2proz. wässeriger Lösung, die Färbung dauert 2—4 Stunden. Bei zu langer Färbung färben sich die Zellwände mehr oder minder mit und lassen sich beim Entwässern in Alkohol schwer wieder entfärben.

Schließlich sei noch ein Verfahren von Mc. Lean[1]) zur Färbung von Cyanophyceen wiedergegeben.

Die frischen Algen kommen auf 3 Tage in ein Gemisch von je 1 ccm 1proz. Lösung von Methylenblau und Bismarckbraun (in 70proz. Weingeist) und 50 ccm destilliertem Wasser, dann nach Waschen in destilliertem Wasser in 5proz. Schwefelsäure oder 5proz. Kalilauge und nach nochmaligem Waschen in eine gesättigte Kaliumquecksilberjodid-Lösung. Der Zentralkörper wird dunkelblau, das periphere Protoplasma gelb.

Paramylon

Paramylon, $C_6H_{10}O_5$, von Gottlieb[2]) 1850 in Euglena entdeckt und in größerer Menge dargestellt, soll bei der Hydrolyse Traubenzucker liefern. Seine Bildung ist nicht an die Gegenwart von Chromatophoren gebunden, es entsteht vielmehr im Cytoplasma und ist wahrscheinlich ein Reservestoff[3]). In Dauer-

[1]) R. C. Mc. Lean, A method of staining Cyanophyceae, New Phytol., 1914, XIII, S. 71; Ref. Bot. Zentralbl., 1914, CXXVI, S. 171.

[2]) J. Gottlieb, Über eine neue mit Stärkemehl isomere Substanz, Ann. d. Chem. u. Pharm., 1851, LXXV, S. 51.

[3]) W. Khawkine, Rech. biol. sur l'Astasia ocellata et l'Euglena viridis, Ann. Sc. nat. Zool., 1885, 6. sér., XIX, S. 238. — O. Bütschli, Beitr. z. K. d. Paramylons, Arch. f. Protistk., 1906, VI, 197.

zuständen wird Paramylon gespeichert. Ein Verbrauch ist beobachtet worden während und kurz nach der Keimung der Dauercysten (Euglena grac.), bei Verdunkelung und beim Ergrünen der im Dunkeln gehaltenen Kulturen. (Zumstein, Lit. S. 776.)

Paramylon kommt nicht nur im Cytoplasma der Euglenen vor, sondern auch in Amöben und Cysten von Leptophrys vorax (Zopf in Schenks Hdb., 1887, III, 17). Die Paramylonkörner sind kugelig oder stäbchenförmig oder flach scheibenförmig und linsenförmig, seltener ringförmig (oft 6 μ lang, 3 μ breit). Sie zeigen teils deutliche ringförmige Schichtung, teils wird eine Schichtung erst bei Einwirkung von Quellungsreagentien u. a. (Chlorzink, Kalilauge, Formalin) sichtbar. Ein Schichtungszentrum fehlt stets. Sie zeigen im polarisierten Licht keine Aufhellung mit Ausnahme der in der Ein- oder Zweizahl vorkommenden großen Körner (Czurda). Die Gebilde sind sehr wenig erforscht. Von Jodreagentien werden sie nicht gefärbt; von 5proz. Kalilauge werden sie augenscheinlich nicht angegriffen, hingegen von 6proz. Kalilauge unter starker Quellung gelöst. Farbstoffe werden nicht gespeichert (Klebs, Lit. S. 782). Von Schwefelsäure (56proz. und stärker) werden sie gelöst (Bütschli), von Kupferoxyammoniak erst nach Monaten etwas angegriffen; durch Wasser werden bei 150° geringe Anteile herausgelöst.

Cellulinkörner

Als Cellulinkörner bezeichnet Pringsheim[1]) eigenartige Körner in den Schläuchen der Saprolegnien und Achlyen, die bald die Gestalt rundlicher oder polyedrischer Plättchen besitzen, bald kugelförmig erscheinen und deutlich geschichtet sind. Kern und äußere Schicht scheinen von einer dichteren Substanz gebildet zu werden. Sie geben weder Stärke- noch Eiweißreaktion, lösen sich nicht in Weingeist, in Äther und in Alkalien, unter Deckglas nicht in Kupferoxydammoniak, sind aber leicht löslich in Schwefelsäure (1 + 1) und in nicht zu verdünnter Chlorzinklösung. Pringsheim betrachtet die Substanz der Körner als eine Zellulosemodifikation, die der Fibrose von Frémy nahesteht.

Zellulosekörner

Einfache oder zusammengesetzte geschichtete Körner, die sich gegen Jod-Schwefelsäure und Chlorzinkjod wie Zellulose verhalten, finden sich nach Weber van Bosse[2]) in der Alge Phytophysa Treubii.

---

[1]) N. Pringsheim, Über Cellulinkörner, eine Modifikation der Zellulose in Körnerform, Ber. d. bot. Ges., 1883, I, S. 288.

[2]) Weber van Bosse, Études sur les algues de l'archipel malaisien II, Annal. jardin bot. Buitenzorg, VIII, S. 165.

die parasitisch in der Urticacee Pilea lebt. Sie sind wahrscheinlich ein Reservestoff, da sie während der Sporenbildung zum großen Teil aufgelöst werden.

Dictydinkörner

Das bläuliche Plasmodium von Dictydium und das grünschwarze von Cribaria besitzen glänzende braunschwarze Körner, die de Bary zuerst auffand und die sich durch eine auffallende Resistenz gegen Säuren und Alkalien auszeichnen. Sie wurden von Jahn[1]) als Nebenprodukte des Stoffwechsels betrachtet. Dictydinkörner genannt und sollen den Cellulinkörnern (S. 859) nahestehen. Sie nehmen Farbstoffe aus dem Plasma auf und speichern Farbstoffe (Fuchsin, Gentianaviolett, Safranin, Rutheniumrot). Setzt man nach Fixierung mit Sublimatalkohol Fuchsin und Jodgrün gleichzeitig zu, dann wird das Plasma rot und die Dictydinkörner werden grün. Mit Safranin-Gentianaviolett werden die Dictydinkörner rot, das Chromatin der Kerne erscheint blau. Sie verhalten sich in dieser Hinsicht wie die Vakuolen der ruhenden Myxomycetenkerne. Mit Millon färben sie sich nicht (Plasma wird rot), mit Jod reagieren sie ebenfalls nicht oder (im Gegensatz zum Plasma) doch nur schwach. Kalilauge bringt sie zur Quellung, löst sie aber ebenso wenig wie konzentrierte Schwefelsäure. — Weitere mikrochemische Prüfungen sind erforderlich.

Fibrosinkörper

Die von Zopf aufgefundenen Fibrosinkörper sollen der Pilzcellulose nahestehen (?) und seien daher hier kurz erwähnt, trotzdem sie ganz ungenau erforscht sind und von Foëx[2]) eine andere Deutung erfahren haben. Sie kommen (2—8 μ groß) im Cytoplasma der Conidien von Podosphaera oxyacanthae und anderer Erysipheen vor und haben eine ganz eigenartige Gestalt (schalenartig, trichter-, zylinderförmig). Es ist angebracht, die Sporen zuvor mit Salpetersäure oder mit Kalilauge aufzuhellen oder sie durch Druck zu isolieren. Nachstehende mikrochemische Reaktionen werden angegeben: Sie sind unlöslich in Weingeist, Äther, Chloroform, Kupferoxydammoniak, Chlorzinkjod, Salpetersäure (selbst nach 48stündiger Einwirkung), kalter Kalilauge,

---

[1]) A. de Bary, Die Mycetozoen (Schleimpilze) II. Aufl., 1884. — E. Jahn, Myxomycetenstudien 1. Dictydium umbilicatum Schrader, Ber. d. bot. Ges., 1901, XIX, S. 97.

[2]) W. Zopf, Über einen neuen Inhaltskörper in pflanzlichen Zellen, Ber. d. bot. Ges., 1887, V, S. 275. — E. Foëx, Les „Fibrosinkörper" de Zopf et leurs radiations avec les corpuscules métachromatiques, Compt. rend., 1912, CLV, 661. Sie sollen aus Volutin hervorgehen und bei der Keimung der Conidien verschwinden.

schwer löslich in konzentrierter Schwefelsäure. In heißem Wasser quellen sie zu rundlichen, in warmer Kalilauge zu unregelmäßigen Gebilden auf. Von Jodreagentien und von Osmium werden sie nicht gefärbt, Anilinfarben werden nicht gespeichert.

Elaioplasten und Ölbildner

Das fette Öl entsteht im allgemeinen im Zellplasma (S. 244). Bei vielen Monokotylen und einigen Dikotylen (Malvaceen) findet es sich an Gebilde gebunden, die wir Elaioplasten (Wakker, Lit. S. 183, 3) nennen. Sie finden sich besonders in Blättern und zwar im Cytoplasma. Ähnliche Bildungen kommen bei niederen Pflanzen vor, treten regelmäßig bei Lebermoosen, vereinzelt auch bei Farnen, so bei Psilotum (Zimmermann), Botrychium und Ophioglossum (Molisch) auf, bei Diatomeen[1]) (auch gefärbt, können Arten und Genera charakterisieren, Lit. S. 807, 3), Saccharomyces[2]) (?) und wurden Ölbildner genannt. Wenn auch zwischen Elaioplasten und Ölbildnern Unterschiede bestehen, so ist doch bei beiden gemeinsam, daß das Fett oder eine fettähnliche Substanz an eine protoplasmatische Grundlage gebunden ist. Wakker hält beide Bildungen für identisch. Die Elaioplasten von Vanilla sind nach A. Meyer eine Emulsion von Fett mit Eiweiß.

Die **Elaioplasten** sollen durch eine als Degenerationserscheinung zu deutende Aggregation der Leukoplasten entstehen[3]). Vor dem Absterben der Zellen, oft schon früher, werden sie resorbiert. Ganz junge Elaioplasten 1 mm langer Blütenblätter sollen ölfrei sein[4]). Ausgewachsene Elaioplasten gleichen im Aussehen emulsionsartigen Ölkörpern. Die anormale Plasmolyse (S. 729) zeigt, daß sie im Plasma liegen. Eingehender studiert sind die Elaioplasten von Vanilla planifolia (bis 10 μ groß, in der Nähe des Zellkerns in der Epidermis jüngerer Blätter und in den peripheren Teilen jüngerer Triebe), Ornithogalum pyramidale, Funkia coerulea[5]), in den Haaren von Gaillardia, im Milchsaft einiger Pflanzen (Homalanthus populneus u. a., Molisch).

Die Zusammensetzung der Elaioplasten (Eiweiß und Fett) schreibt den mikrochemischen Untersuchungsgang vor. Die Löslichkeitsverhältnisse werden festgestellt, Fett- und Eiweißreaktionen ausgeführt, sowie Färbungen. Das Fett löst sich in Äther, Weingeist, Chloro-

---

[1]) O. Richter, Zur Physiologie der Diatomeen, 2. Mitt., Denkschr. Wien. Ak., 1909, LXXXIV, S. 660.

[2]) Nach H. Will (Zentralbl. f. Bakt., 1895, II, S. 760) sollen die Fetttropfen der Hefe ein Eiweißgerüst besitzen.

[3]) R. Beer, On Elaioplasts, Ann. of Bot., 1909, XXIII, S. 63.

[4]) W. v. Küster, Die Ölkörper der Lebermoose und ihr Verhältnis zu den Elaioplasten, Dissert. Basel, 1894.

[5]) M. v. Raciborski, Über die Entwicklungsgeschichte der Elaioplasten, Akad. Krakau, 1893 u. Lit. S. 120, $_1$.

form, Azeton, Petroläther, Ätherweingeist, auch in Kalilauge und Kalilauge-Ammoniak, jedoch ohne Seifenkristalle zu geben. Es ist unter Deckglas unlöslich in Chloralhydrat (5 + 2) und in Eisessig. In konzentrierter Schwefelsäure löst es sich nicht und fließt zu größeren Tropfen zusammen. Nach Entfernung des Fettes (auch aus fixierten Elaioplasten läßt sich das Fett leicht herauslösen) gibt das Stroma deutliche Eiweißreaktion (Jod, Salpetersäure, Millon). Die bei Einwirkung verschiedener Reagentien sichtbar werdende, angeblich aus Eiweiß bestehende Hülle soll ein Kunstprodukt sein.

In lebendem Zustande lassen sie sich in 4proz. Rohrzuckerlösung studieren. Zur Fixierung dienen Osmiumsäure, 1proz. Chromsäure, konzentrierte wässerige Pikrinsäure, 1proz. Essigsäure. Wakker färbte mit Anilinblau-Alkannin (eine dunkelblaue wässerige Anilinblaulösung wird tropfenweise mit Alkannatinktur bis zur dunkelpurpurroten Färbung versetzt), Einwirkung 24 Stunden, Untersuchung in Glyzerin (Kern und Chromatophoren dunkelblau, Plasma hellblau, Fett rot, Elaioplasten dunkelpurpurn). Ferner: Fixierung mit Osmiumsäure, Färbung mit Fuchsin-Jodgrün (ganz dunkle Lösung in 50proz. Weingeist, Dauer 1—5 Minuten), Untersuchung in Glyzerin (Zellkern rötlich-violett, Stroma rötlich, Fett schwarz, v. Küster). Methylgrünessigsäure färbt die Elaioplasten violett, Zellkerne grün (Zimmermann). Eine verdünnte, mit 1proz. Essigsäure oder 1proz. Ameisensäure versetzte Alkannalösung, die man mit Jodgrün vereinigen kann, benutzt Raciborski. Durch den geringen Säurezusatz wird das Stroma genügend fixiert.

Die **Ölbildner** der Lebermoose wurden von den älteren Autoren als Inulin (Schacht), Harz (Gottsche), Wachs u. a. gedeutet (ältere Lit. bei W. Küster). Sie bestehen aus fettem Öl, Wasser und einer plasmatischen Grundsubstanz, kommen (mit Ausnahme der Sporen und der Rhizoiden) in allen Teilen der Lebermoose vor und sind aus Vakuolen hervorgehende Neubildungen (Garjeanne)[1]. Pfeffer[2]) spricht sie für Exkrete an, die Stahl (Pfl. u. Schnecken) für Schutzwaffen hält. Lohmann[3]) fand in der Trockensubstanz einiger Lebermoose 2,3 bis 4,3 % Rohfett.

Die Ölkörper der Lebermoose (Fig. 173) färben sich mit den gebräuchlichen Farbstoffen (in 50proz. Weingeist gelöst) und mit Osmium leicht. Der Färbung geht vorteilhaft eine Härtung durch Eintauchen in 1proz. Chromsäure (½ Minute) oder in 1proz. Osmiumsäure voran. Letztere braucht beim nachfolgenden Färben nicht ausgewaschen

---

[1]) A. J. M. Garjeanne, Ölkörper d. Jungermanniales, Flora 1903, XCII, 457.

[2]) W. Pfeffer, Ölkörper d. Lebermoose, Flora 1874.

[3]) Lohmann, Beitr. z. Chem. u. Biol. d. Lebermoose, Bot. Zentralbl., Beih., 1903, XV, S. 248.

werden. Überfärbte Präparate werden in 50proz. Glyzerin ausgewaschen. Etwa anwesender Gerbstoff (Marchantiaceen) ist bei Osmiumbehandlung durch längeres Kochen der Schnitte mit Wasser zu entfernen. Die Ölmassen lösen sich schnell in Petroläther, Azeton, Äther, Chloroform, Xylol, Benzol, Schwefelkohlenstoff, Nelkenöl, Eisessig, Chloralhydrat, Weingeist, auch in 40proz. Weingeist. In Säuren sind sie unlöslich und geben mit Kalilauge oder Kalilauge-Ammoniak niemals Seifenkristalle (v. Küster, Lohmann). Durch Kochen mit Wasser und Erhitzen auf über 100° verschwinden die Öle nicht (kein ätherisches Öl), andererseits bleiben sie nach Pfeffer bei 5—7° noch flüssig (kein Wachs). Die Hülle der Ölkörper besteht nach Garjeanne wahrscheinlich aus gerbsaurem Eiweiß. Sie läßt sich bei den Jungermanniaceen am besten mit einer konzentrierten wässerigen Pikrinsäurelösung härten und bleibt dann nach erfolgtem Lösen des Öles mit verdünntem Weingeist erhalten. Mit Methyleosin-Gentianaviolett in 50proz. Weingeist färbt sie sich rotviolett. Sie ist aber ein Kunstprodukt, entstanden aus Gerbstoffen des Zellsaftes und aus Eiweißsubstanzen der Ölkörper. Andrews (Lit. S. 25, 1) benutzt zum Nachweis die Zentrifugalkraft, die spezifisch schweren Ölkörper sammeln sich in den zentrifugalen Enden der Zellen an.

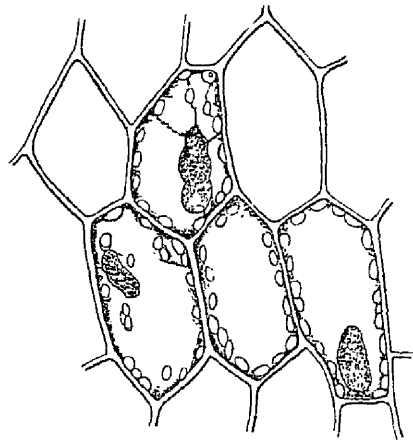



Fig. 173. Marchantia spec. (Flächenschnitt), Ölbildner (Tunmann)

Elaioplasten und Ölbildner zeigen nachstehende Abweichungen: Das Öl der Ölkörper der Lebermoose ist in Eisessig und Chloralhydrat unter Deckglas löslich, dasjenige der Elaioplasten nicht. Doch wird man diesem Verhalten kein allzu großes Gewicht beilegen können, zumal bei den einzelnen Gattungen Abweichungen in der Zusammensetzung der Öle zu bestehen scheinen. Vielleicht halten die Ölbildner der Lebermoose andere Körper (Kohlenwasserstoffe) im Öle in Lösung. Das Stroma der Elaioplasten läßt sich fixieren und gibt deutliche Eiweißreaktion, das Stroma der Ölbildner nur schwache. Weit größer ist der Unterschied in biologischer Hinsicht. Die Elaioplasten werden vor dem Absterben der Zellen resorbiert, die Ölkörper bleiben unverändert.

Ölartige Gebilde in der Epidermis von Potamogeton-Arten, die Lundström (Bot. Centralbl., XXXV, 177) als Elaioplasten anspricht, lösen sich nach Lidforss (Lit. S. 729, 3) bereits in 10proz. Weingeist und führen aromatische Aldehyde (Rotfärbung in den peripheren Zellen von Blattstücken mit Fuchsin-schwefliger Säure). Die von Golenkin

(Lit. S. 129, 2) in Sebdenia aufgefundenen Gebilde führen einen anorganischen Körper (Ascheskelett, Kalzium, Oxalsäure, Phosphorsäure fehlen), geben aber an Weingeist, Äther, Chloroform und Essigsäure keine Bestandteile ab. Die von Berthold (Lit. S. 376, 4) in Florideen beschriebenen Gebilde hält Hansen (Lit. S. 791, 1) für Glykogen, Golenkin für Elaioplasten, da sie sich mit Toluidin-Seewasser färben und in Essigsäure, Äther, 50proz. Weingeist lösen. Durch Chloralhydrat und Kalilauge treten Tropfen aus, Osmium färbt braun, Jodjodkalium gelbbraun. Tschirch (Handb. d. Pharmakogn., 1910, II, 296) beschreibt in Laminarien wulstig-traubige Gebilde, die der Wand anhängen, bei Zutritt von destilliertem Wasser ineinanderfließen, platzen und kleine Öltropfen zurücklassen.

Plasmodesmen

Von Tangl wurden 1879 im Endosperm verschiedener Samen zarte Plasmafäden aufgefunden, welche die Plasmakörper benachbarter Zellen verbinden. Schon vorher (1877) hatte Goroshankin Plasmabrücken beobachtet. Sie wurden später allenthalben auch in den vegetativen Teilen der Pflanzen entdeckt, so daß mehrfach die Ansicht ausgesprochen wurde, daß alle Protoplasten einer Pflanze durch Plasmafäden, durch Plasmodesmen (Strasburger), in Verbindung stehen. Doch kommen bei den grünen Algen Zellkörper und Zellfäden vor, bei denen die Protoplasten der sie zusammensetzenden Zellen nicht durch Plasmabrücken verbunden sind (A. Meyer). Die Plasmodesmen dienen wahrscheinlich der Reizleitung; ob sie der Nährstoffleitung dienen (Pfeffer, Pflz. Phys., 1897, I, S. 97), erscheint noch nicht sicher. Sie entstehen unabhängig von der Zellteilung und werden sehr frühzeitig angelegt (vor Bildung der ersten sekundären Wandlamellen). Mit den ausgesponnenen mittleren Teilen der Zellplattenelemente stehen sie in keinem Zusammenhang.

Nach Jungers (Cellule 1930, VII, S. 40) ist die plasmatische Natur der Plasmodesmen nicht sichergestellt.

Kuhla[1]) verfolgte die Plasmodesmen in der einjährigen Achse von Viscum album und gibt eine graphische Darstellung der Verteilung der Tüpfel und Plasmodesmen. Nach den Milchröhren führen Plasmodesmen, nicht aber nach den Interzellularen. Durch die Außenwände der Sezernierungszellen der Epidermaldrüsen gehen nach Tunmann (Lit. S. 248, 5) in den Sekretraum ebenfalls keine Plasmodesmen (die Ansicht Pfeffers von der Sekretleitung der Plasmodesmen erscheint fraglich). Bei den Außenwänden der Ranken konnte Pfeffer[2]) keine Plasmodesmen ermitteln, die von Gardiner in den Außenwänden von Tamus com. und Lilium mart. angegebenen sind feine Kanäle (de Bary).

---

[1]) F. Kuhla, Die Plasmaverbindungen bei Viscum album, Bot. Ztg., 1900, LVIII, S. 29.

[2]) W. Pfeffer, Zur Kenntn. d. Kontaktreize, Tübinger Arb., 1881/85, S. 524.

Beim Nachweis der Plasmodesmen muß man sich in erster Linie vor Verwechslungen mit Plasmaausfüllungen feiner Tüpfel hüten und darauf achten, daß wirklich Plasmaverbindungen vorliegen, welche die Zellwände oder die Schließhäute der Tüpfel durchbrechen. Im allgemeinen sind die Plasmodesmen ohne weiteres nicht zu erkennen. Ihr sicherer Nachweis hängt von ihrer Stärke und von der betreffenden Zellwand ab. Die Methoden müssen nach den Verhältnissen abgeändert werden. Zur Anwendung gelangen Färbungen, die mit Fixierung und wenn nötig mit Quellungsmitteln verbunden werden.

Sehr leicht sind die Plasmodesmen ohne Anwendung von Quellungsmitteln und ohne Fixierung im starkwandigen Endosperm vieler Samen zu erkennen. Auf alle Fälle sind zarte und entfettete Schnitte zu wählen. An solchen sieht man sie bei Strychnos-Arten ohne weitere Präparation. Schärfer treten sie nach Färbungen hervor. Die Schnitte (Phytelephas, Strychnos, Physostigma u. a.) gelangen auf 5—10 Minuten in 0,5proz. Farbstofflösungen und werden in Glyzerin untersucht. Die Plasmodesmen werden deutlich gefärbt und erscheinen als homogene Fäden. Kohl[1]) empfiehlt Methylviolett und Safranin „genügend" lange „in möglichst dünnen Lösungen" anzuwenden. Benutzt man Jodreagentien, so werden sie gefärbt und gleichzeitig fixiert; man beläßt die Schnitte einige Tage unter Deckglas[2]) in Jodjodkalium (0,17 J, 0,1 KJ, 20,0 H_2O) oder in Chlorzinkjod. Die Färbung wird verstärkt, wenn man etwas Jod zur Ausscheidung bringt. Moore[3]) legt Endospermschnitte in weingeistige Jodlösung, die mit Wasser versetzt ist. Die Plasmodesmen erscheinen dunkler gefärbt als die Zellwand. Die Jodausscheidung kann auch durch Chlorzinkjod bewirkt werden (Fig. 174).

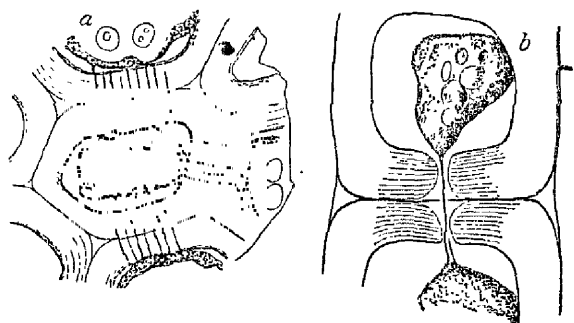



Fig. 174. Plasmodesmen. *a*) Strychnos nux vomica (Endosperm, frisches Material, entfettet, dann Jodjodkalium-Chlorzinkjod), die Plasmodesmen sind nur zum Teil erhalten; *b*) Arctostaphylos uva ursi (Blattstiel, subepidermales Parenchym), Behandlung nach dem Pyoktanin-Verfahren (Tunmann)

[1]) F. G. Kohl, Dimorphismus der Plasmaverbindungen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1900, XVIII, S. 364.

[2]) Ed. Tangl, Über das Endosperm einiger Gramineen, Sitzgsb. Wien. Akad., 1885, XVII, $_1$, S. 72.

[3]) M. Moore, Observations on the continuity of Protoplasma, Journ. Linn. Soc. Bot., 1886, XXI, S. 595.

Von Quisumbing[1]) wurde bei Samen von Diospyros-Arten folgende Methode angewandt:

Die Schnitte werden 48 Stunden in Bouins Flüssigkeit[2]) fixiert, dann mit 50proz. Weingeist bis zum Verschwinden der gelben Färbung gewaschen. Fortsetzung nach zwei Verfahren.

1. Einen Tag in weingeistige Safraninlösung[3]); Waschen mit Wasser zur Entfernung des Safranins; vier Tage in wässeriges Gentianaviolett[4]); Waschen in Wasser; nacheinanderfolgendes Passieren von je zwei Minuten Dauer durch 50proz., 95proz. und 100proz. Weingeist; dann durch Nelkenöl und Xylol in Kanadabalsam.

2. Aus dem 50proz. Weingeist in solchen von 30% und 10%, dann in Wasser, bis keine Spur Weingeist mehr vorhanden; 2 Stunden in 2proz. Eisenalaun, dann über Nacht in 0,5proz. Hämatoxylin (6 Wochen alt), Waschen mit Wasser, Eintragen in Eisenalaun, sorgfältig mit Wasser waschen; je 5—10 Minuten in Weingeist von 10, 30, 50, 80, 95 und 100%, fünf Minuten in eine Lösung von Goldorange in Nelkenöl, dann Nelkenöl, Xylol, Kanadabalsam.

Zu den leicht sichtbar zu machenden Plasmaverbindungen zählen die der **Siebröhren**. Siebplatten färbte schon Hanstein mit weingeistiger Jodlösung (1:10) und verstärkte die Färbung durch nachfolgenden Zusatz von Chlorzinkjod. Russow[5]) gebrauchte zum Plasmodesmen-Nachweis Mischungen von Jodjodkalium mit Chlorzinkjod. Zimmermann (Mikrot., S. 240) färbte Cucurbitaceen nach vorausgegangener Fixierung durch kochendes Wasser und bei Benutzung von Mikrotomschnitten mit Altmanns Säurefuchsin. Strasburger benutzt Alkoholmaterial, fertigt Freihandschnitte und färbt direkt mit Anilinblau. Versuchsobjekte sind Tilia, Vitis, Aristolochia, Cucurbita, besonders Kraunhia floribunda, die kurze Glieder „und fast senkrecht zu deren Verlauf orientierte Siebplatten" hat, ein wesentlicher Vorteil. Da diese Methoden bei den Siebröhren meist zum Ziele führen dürften, so ist das Verfahren Gardiners (Lit. S. 713, 1) entbehrlich; es wird eine Lösung von Hofmanns Violett (Methylviolett B. extra, Kahlbaum) in konzentrierter Schwefelsäure verwendet, in welche die Schnitte auf etwa eine Minute gelangen, um

[1]) E. Quisumbing, Continuity of protoplasm in endosperm cells of Diospyros, Botan. Gazette, 1925, LXXX, S. 439.

[2]) Gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung 15 Teile; käufliches Formol 5 Teile, Eisessig 1 Teil.

[3]) 10 g Safraninkristalle werden in 500 ccm 95proz. Weingeist gelöst; am nächsten Tag wird mit Wasser zu einem Liter aufgefüllt und filtriert.

[4]) 1proz. wässerige nach eintägigem Stehen filtrierte Lösung von Gentianaviolett.

[5]) E. Russow, Über die Verbreitung der Callusplatten bei den Gefäßpflanzen, Sitzgsb. Naturf.-Ges. Dorpat, 1883, VI, S. 63.

dann in viel Wasser ausgewaschen zu werden. Das Reagens ist von brauner Farbe und bräunt die Schnitte in der kurzen Zeit der Einwirkung nur wenig. Beim Auswaschen werden die Präparate grün, dann blau und schließlich behalten die Protoplasten und die Plasmodesmen eine violette Färbung. Zimmermann benutzt hierzu Alkoholmaterial. Feine Schnitte werden auf dem Objektträger mit Fließpapier abgetrocknet, mit einem Tropfen Methylviolett-Schwefelsäure bedeckt und das Deckglas aufgelegt. Nach 1—2 Minuten wird der ganze Objektträger in eine große Schale mit Wasser getaucht, worin er bis zum Violettwerden der Schnitte verbleibt. Gewöhnlich wird das Deckglas fortgeschwemmt. Doch bleiben immer am Objektträger einige Präparate haften, die zur mikroskopischen Prüfung herangezogen werden.

Entwicklungsgeschichtlich sind die Siebtüpfel und die Verbindungsfäden bei den Coniferen eingehend untersucht worden. Hill[1]) fixierte nach Gardiner (s. weiter unten) und färbte mit Safranin und Anilinblau. Im primären Zustande zeigen die Siebtüpfel in der Mittellamelle Pektin und Zellulose, in der Verdickung aber Zellulose. Die Tüpfel werden von Plasmodesmen durchsetzt. Letztere gehen in Schleimfäden über und enthalten Enzyme, welche die Zellulose in Callose überführt. Durch Safranin-Anilinblau werden die Schleimfäden rot, die Callusmassen blau. Doch ist das Alter der Fäden von Einfluß auf die Befunde.

Wesentlich schwieriger gestaltet sich der Nachweis, wenn zarte Plasmodesmen vorliegen und die Zellwände sehr dünn sind. In solchen Fällen müssen neben den Färbungen und der Fixierung auch Quellungsmittel benutzt werden. Nach der Fixierung erscheinen die Plasmodesmen entweder homogen oder stäbig und körnig. Von 1proz. Osmiumsäure werden die Plasmodesmen völlig homogen fixiert (A. Meyer)[2]); weniger gut fixiert konzentriertes Jodjodkalium (3,0 J, 3,0 KJ, 20,0 H_2O) und Kaliumwismutjodid[3]). Hingegen fixiert schwächeres Jodjodkalium (1,0 J, 1,0 KJ, 200,0 H_2O) die Plasmodesmen körnig. Letzteres, das meist benutzt wird, wirkt bei nachfolgender Färbung zugleich als Beize. Wie Jod wirkt konzentrierte Pikrinsäurelösung. Bei Volvox fixiert gut eine 2proz.

[1]) A. W. Hill, The histology of the Sieve-Tubes of Pinus, Ann. of Bot., 1902, XV, S. 575.

[2]) A. Meyer, Üb. d. Meth. z. Nachweis. d. Plasmaverbindungen, Ber. deutsch. bot. Ges., XV, S. 166.

[3]) Nach folgender Vorschrift: 80 g basisches Wismutnitrat werden in 200 ccm reiner Salpetersäure, spez. Gew. 1,8, gelöst und 272 g KJ in wenig H_2O; die Wismutlösung wird langsam und unter Umschütteln in die Jodlösung gegossen, dann wird vom auskristallisierenden Salpeter abfiltriert und im braunen Glase aufbewahrt.

Lösung von Chlorgoldnatrium und konzentrierter Salpetersäure mit nachfolgendem Ammoniakzusatz[1]).

Die Färbungen werden teils durch Jod, teils durch Anilinfarben, Safranin, Methylviolett, Bayrischblau, Hämatoxylin und Pyoktanin bewirkt. Als Quellungsmittel dient vorzüglich Schwefelsäure, die nicht zu konzentriert benutzt werden darf. Als Übungsobjekte benutze man Tangentialschnitte von Samen und des primären Rindenparenchyms zentimeterstarker Zweige unserer Dikotylen. Allgemein gültige Vorschriften lassen sich nicht geben. Die Verfahren müssen von Fall zu Fall mehr oder weniger abgeändert werden. Nachstehend sind von den zahlreich vorgeschlagenen Methoden die hauptsächlichsten angeführt.

Hillhouse[2]) fixiert das Material mit Weingeist, bringt zarte Schnitte auf einige Minuten auf den Objektträger in verdünnte Schwefelsäure und läßt 20—48 Stunden konzentrierte Schwefelsäure einwirken, ohne das Deckglas aufzulegen. Nach dem Auswaschen mit destilliertem Wasser wird mit Ammoniak-Carmin gefärbt, mit dem Deckglas bedeckt und in Glyzerin aufbewahrt. Die Zellwand ist gelöst, von der Interzellularsubstanz sind zuweilen Reste vorhanden. Durch die konzentrierte Säure werden naturgemäß feine Plasmaverbindungen verzerrt und zerrissen werden. Bekannter ist die Methode von Russow (Lit. S. 712, 4). Die aus frischem Material hergestellten Präparate werden auf dem Objektträger mit Jodjodkalium (0,2 J, 1,64 KJ, 100,0 H_2O) gut durchtränkt und das Deckglas aufgelegt. Am Deckglasrande wird 1 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure mit 3 Tropfen verdünnter Schwefelsäure (3 + 1 Teil Wasser) zugesetzt und die Säure bis zur Schwarzblaufärbung der Präparate durchgesaugt. Nun wird das Deckglas abgehoben, die Säure ausgewaschen, indem man die Präparate auf dem Deckglase auf 3—5 Minuten in Wasser bringt und schließlich wird mit einer konzentrierten wässerigen Lösung von Bayrischblau oder Methylviolett (A. Meyer) gefärbt. Russow gebrauchte ein Anilinblau. Da bei diesem Verfahren auf dem Objektträger gearbeitet wird, so ist die mikroskopische Kontrolle, die unbedingt erforderlich ist, bequem durchzuführen.

Terletzki[3]) fixierte die Schnitte im Uhrgläschen mit Jodjod-

---

[1]) A. Meyer, D. Plasmaverbind. u. d. Membr. v. Volvox globat., aur. u. tert., m. Rücks. auf d. tier. Zell., Bot. Ztg., 1896, LIV, S. 188.

[2]) W. Hillhouse, Einig. Beobacht. üb. d. interzell. Zusammenh. v. Protoplasten, Bot. Centralbl., 1883, XIV, S. 89.

[3]) P. Terletzki, Anat. d. Vegetationsorg. v. Struthiopteris germ. u. Pteris aq., Jahrb. f. wiss. Bot., 1884, XV, S. 452.

kalium, goß die Lösung ab, füllte auf einige Minuten mit Schwefelsäure (3 + 1 Teil Wasser) auf und färbte nach gutem Auswaschen mit einer konzentrierten Lösung von Anilinblau. Die mikroskopische Kontrolle der Wirkung der Reagentien ist hierbei schwer durchführbar. In ähnlicher Weise verfuhr Kienitz-Gerloff[1]). Seine Jodlösung ist für alle Methoden brauchbar (0,05 J, 0,02 KJ, 15,0 H_2O) und ebenso liefert die von ihm benutzte konzentrierte wässerige Lösung von Methylviolett brauchbare Ergebnisse.

Die Vorteile der Methode von A. Meyer beruhen in der Anwendung einer möglichst verdünnten Säure, wodurch zu starke Quellung verhütet wird, in der ständigen mikroskopischen Kontrolle und in der Benutzung von Pyoktanin, einem Farbstoff, der beim Bezug zu Verwechslungen keinen Anlaß geben kann. Die Schnitte kommen auf einige Minuten in ein Uhrglas mit Jodjodkalium (0,1 J, 0,1 KJ, 20,0 H_2O) und werden mit einem kleinen Tropfen Jodlösung auf den Objektträger unter Deckglas gebracht. Nun wird am Deckglasrande Jod-Schwefelsäure zugesetzt (1 + 3 Teile Wasser, die Säure wird durch Stehen über etwas Jod mit Jod gesättigt), wodurch das Präparat dunkler gefärbt erscheint, die Quellung der Membran aber sehr gering ist. Jetzt wird in gleicher Weise ein kleiner Tropfen Pyoktaninlösung (1,0 Pyoktanin coeruleum Merck, 30,0 Wasser) zugefügt und die Einwirkung verfolgt. Der Farbstoff dringt gewöhnlich langsam vor, färbt den Rand des Präparates grünlich, die Protoplasten werden fast schwarz. „Man läßt den Farbstoff noch 3 Minuten einwirken und taucht nun Objektträger mit Präparat und Deckglas in eine Schale mit ungefähr 400 ccm Wasser so ein, daß die nicht vom Farbstoff erreichte Partie des Schnittes nach oben gekehrt ist und auch so vom konzentrierten Farbstoff nicht erreicht wird.“ Das Präparat wird schnell abgespült und auf einem anderen Objektträger in Glyzerin untersucht (Fig. 174b und Fig. 175). Von körnigen Niederschlägen kann man den Schnitt durch Abpinseln befreien, hierzu empfiehlt Gardiner Kameelhaarpinsel. Nach völligem Austrocknen können diese Präparate direkt in Kanadabalsam eingeschlossen werden (Membran hellblau, Protoplasma und Plasmodesmen schwarzblau). Man kann auch Methylviolett 5 B (Bad. Sodafabr.), Hofmannsblau (Grübler) und Methylviolett B und 5 B (Bayer, Elber-

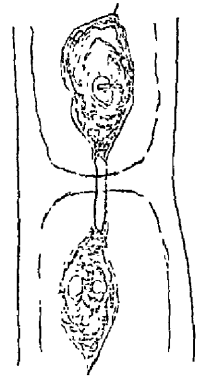



Fig. 175. Pelargonium spec. (Stielzellen einer Drüse), Behandlung mit A. Meyers Pyoktanin (Tunmann)

[1]) F. Kienitz-Gerloff, Die Protoplasmaverb. zwischen benachb. Gewebselem. i. d. Pfl., Bot. Ztg., 1891, XLIX, S. 1.

feld), benutzen. Säureviolett 6 B (Elberfeld) wird ebenfalls empfohlen[1]).

Die im vorstehenden beschriebene Methode wurde von Gardiner[2]) etwas abgeändert. Bei zarten Geweben erfolgt Tötung und Fixierung mit einer Lösung von 0,1—0,2 % J und 0,15—0,25 % KJ, bei stärkeren Geweben mit einer Lösung von 0,5 % J und 0,75 % KJ. Zur Quellung dient bei zarten Objekten (Chara, Mnium undul.) 1—5 proz. Schwefelsäure, bei Aucuba japonica 30 proz. Schwefelsäure. Darauf folgt Beizung mit Jodschwefelsäure (0,5—0,75 % J und 1,0—1,25 % KJ in 5 proz. Schwefelsäure). Nach Abspülung mit einer Jodschwefelsäure, die 5 % Schwefelsäure, 0,1 % J und 0,15 % KJ enthält, wird gefärbt. Zur Färbung (10 Minuten) wird ein Gemisch gleicher Vol. von 10 % Schwefelsäure und von 1 % oder 5 % Pyoktanin oder Gentianaviolett benutzt. Durch Nachbehandlung mit Jodschwefelsäure kann die Färbung verstärkt werden. Die gefärbten Schnitte lassen sich in einem erwärmten Gemisch von 30 ccm Glyzerin, 60 ccm Wasser, 10 ccm 20 proz. Zinkchloridlösung und 1 bis 2 Jodsplitterchen fixieren und können in Glyzeringelatine eingeschlossen werden. — Gewebe, die nicht zu quellen brauchen, werden mit dem Kolossowschen Gemisch (½ % Osmiumsäure und 2—3 % Urannitratlösung) fixiert.

Strasburger bringt die aus lebendem Material hergestellten Schnitte sofort[3]) auf 5—7 Minuten in eine 1 proz. Osmiumsäure, spült mit Wasser ab, überträgt auf 20—30 Minuten in Russowsche Jodjodkaliumlösung (S. 868) und läßt die Schnitte dann in 25 proz. Schwefelsäure ½ Stunde bis einen Tag lang quellen. Schließlich wird innerhalb 5 Minuten gefärbt mit „25 %, mit Jod und einem Tropfen Meyerscher Pyoktaninlösung in Wasser, im Verhältnis 1 : 30, versetzter Schwefelsäure". Empfehlenswert ist auch 2 stündige Fixierung mit Pikrinschwefelsäure (nach Němec)[4]): 100 Teile kalt gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung, 0,5 Eisessig, 0,5 Schwefelsäure), Quellung in 25 proz. Schwefelsäure und Färbung mit Pyoktanin.

Das Verfahren von Schaarschmidt scheint nicht nachgeprüft zu sein. Die Schnitte des mit Alkohol gehärteten Materials werden unter Deckglas mit wenig Schwefelsäure (1 + 2 Teile Wasser) versetzt (mikroskopische Kontrolle!). Nach gutem Auswaschen mit Wasser wird mit Ammoniak neutralisiert und mit

---

[1]) Th. Wulff, Plasmodesmenstudien, Österr. bot. Zeitschr., 1906, LVI, S. 1.

[2]) W. Gardiner, Methods for the demonstr. of „connecting threads" in the cell wall, Proc. Cambridge Phil. Soc., 1898, IX, S. 504 und: Histol. of cell wall with spec. refer. to the mode connec. of cells, Proc. R. Soc. London, 1898, LXII, S. 102.

[3]) Wenn die Abtötung der Protoplasten nicht genügend schnell erfolgt, dann reißt oft der sich kontrahierende Protoplast von den Plasmodesmen ab; letztere bleiben in den Membranen nachweisbar.

[4]) B. Němec, Über die karyokinetische Kernteilung in der Wurzelspitze von Allium Cepa, Jahrb. f. wiss. Bot., 1899, XXXIII, S. 314.

wässerigen Eosin- oder mit alkoholischer Safraninlösung unter Deckglas gefärbt. Bei Eosinfärbungen sollen die Membranen ungefärbt bleiben[1]). Eosin wurde auch von Macfarlane[2]) benutzt (1—2std. Einwirkung von 25proz. Schwefelsäure, Auswaschen in Wasser, 1std. Einwirkung von konzentrierter wässeriger Eosinlösung und schnelles Nachwaschen). Durch 2proz. Eisessig läßt sich die Färbung fixieren. Wenig in Aufnahme gekommen sind die Methoden, welche die Färbungen nachträglich differenzieren. A. Meyer erprobte Hämatoxylin. Die mit Alkohol oder mit Osmiumsäure gehärteten Schnitte gelangen auf 1 Tag in Hämatoxylin (Delafield), werden einige Minuten in Salzs.-Alkohol (0,5 Salzsäure, 100 Alkohol 60 %) gebracht, nachher in Ammoniak-Alkohol (10 Tropfen offiz. Ammoniak, 100,0 Alkohol 60 %) ausgewaschen; schließlich folgt nacheinander absoluter Alkohol, Xylol, Kanadabalsam. Die Membran soll zuweilen farblos bleiben, doch sind die Plasmodesmen oft nicht gleichmäßig gefärbt.

Liegt nur mit Formalin (2proz.) fixiertes Material vor, dann versagen nach Bálint[3]) die bekannten Methoden; er wäscht daher mit 90proz., dann mit 70proz. Weingeist gut aus, färbt mit Säurefuchsin (20 g Säurefuchsin, 3 ccm Anilinöl, 200 ccm destilliertes Wasser). Dann folgt Auswaschen (15 Minuten) mit Pikrinsäure (1 Teil gesättigte Lösung in 96proz. Weingeist + 2 Teilen Wasser verdünnt), schließlich Passage mit 96proz. Weingeist, Benzolalkohol, Benzol (jede Flüssigkeit mit wenig Pikrinsäure versetzt) und Einschließen in Benzolbalsam.

Es war bereits betont, daß der Nachweis der Plasmodesmen bei dünnwandigen Membranen nicht leicht ist. So gibt Kny (Lit. S. 713, 4) an, daß er mit den üblichen Methoden keine brauchbaren Resultate erhalten habe, wohl aber zum Ziele gelangt sei bei Benutzung einer mehrere Jahre alten Chlorzinkjodlösung mit Hilfe des Verfahrens von Michniewicz (Öst. bot. Ztschr., 1904, LIV, Nr. 5). Nach diesem werden größere Stücke mit glatter Schnittfläche 5 Minuten in absolutem Alkohol gekocht. Parallel zur Schnittfläche hergestellte Präparate werden in Chlorzinkjodlösung gelegt und untersucht.

Pfeiffer-Wellheim[4]) macht die Plasmodesmen sichtbar, indem er die Gegenstände in toto oder Schnitte zunächst in Jod legt, dann in Silbernitrat und schließlich das entstandene Jodsilber zu metallischem Silber reduziert.

---

[1]) J. Schaarschmidt, Kommunikat. v. Protoplast. u. d. Vorkomm. interzellul. Protoplasmas, Zeitschr. wiss. Mikr., 1884, I, 301. Mit Eosin färben sich nur die Membranen der Bastfasern von Carica Papaya.

[2]) J. M. Macfarlane, Contr. to the history of Dionaea muscipula, Contr. of. Bot. Labor. of Pennsylvania, 1892, I, S. 7.

[3]) S. Bálint, Bot. mikrot. Not., Zeitschr. wiss. Mikr., 1910, XXVII, 243.

[4]) F. Pfeiffer-Wellheim, Über ein Silberimprägnierungsverfahren zur Darstellung der Plasmodesmen in einigen Endospermgeweben und bei Moosblättchen, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1924, XLI, S. 325.

a) Imprägnierung des Objektes in toto:

Bei größeren Gegenständen, wie den Samen von Strychnos, Phytelephas, Lodoicea u. dgl. schneidet man mit der Laubsäge senkrecht gegen die Oberfläche und die darunterliegenden Schichten 3—4 mm im Quadrat messende Würfelchen oder Prismen heraus (trocken oder nach 24stündigem Einweichen in Wasser). Von kleineren Gegenständen wie den Früchten von Zea Mays und Triticum vulgare wird nach 12—24stündigem Erweichen in Wasser die „Samenhaut", soweit sie nicht angewachsen ist, entfernt. Man kann auch durch Anschneiden das leichtere Eindringen der Lösungen ermöglichen.

Man bringt dann die Gegenstände ungefähr 3 Tage in eine reichliche Menge Jodlösung (1 g Jod + 1 g Kaliumjodid + 100 ccm Wasser + einige Tropfen Jodtinktur), die bei Hellwerden oder Verbrauch durch Alkaloide ein- oder mehrmal erneuert werden muß. Nachdem das Jod tief genug eingedrungen, bringt man die Gegenstände für 2—3 Tage in einige Kubikzentimeter verdünnte Schwefelsäure (1 Teil konzentrierte Schwefelsäure + 3 Teile Wasser); dann werden sie flüchtig mit Wasser abgespült und in eine reichliche Menge einer ½ bis 1proz. wässerigen Silbernitratlösung übertragen, in der sie mehrere Tage bei Lichtabschluß bleiben. Man wäscht in fließendem oder oft gewechseltem Wasser. Die daraus angefertigten Schnitte werden mit einem Hydrochinon-Entwickler (die Lösung von 25 g Natriumsulfit in 100 ccm Wasser wird mit 2 g Hydrochinon und 40 Tropfen Formol 40proz. versetzt), bei hellem Tageslicht oder direktem Sonnenlicht reduziert, indem man die in einer weißen Glasdose befindlichen Schnitte, die sich gegenseitig nicht decken dürfen, nach Übergießen mit dem Entwickler auf weißer Unterlage dem Lichte aussetzt, wozu in der Regel 15—30 Minuten genügen. Die Plasmodesmen erscheinen als tiefschwarze Linien auf nahezu weißem oder bei stärkerer Färbung der Zellmembranen auf gelb bis gelbbraunem Grunde.

Zur sicheren Entfernung letzter Reste nicht reduzierten Jodsilbers bringt man die Schnitte, nachdem man sie abgespült hat, für etwa 10 Minuten in eine 5- bis 10proz. Lösung von Natriumthiosulfat und wäscht gründlich aus. Einschließen am besten in Glyzeringelatine.

b) Imprägnierung von Schnitten.

15—20 Minuten in die Jodjodkaliumlösung, 5 Minuten in verdünnte Schwefelsäure (100 Teile Wasser + 30 Teile Schwefelsäure); nach oberflächlichem Abtrocknen mit Fließpapier in ungefähr ½proz. wässerige Silbernitratlösung. Auswaschen und Reduzieren wie oben, ebenso Einzelheiten.

c) Imprägnierung von Moosblättchen.

Im allgemeinen wie b. Die mit Jodjodkalium fixierten Moosstämmchen kommen bis zu 12 Stunden in verdünnte Schwefelsäure, dann nach Abspülen mit Wasser nochmals für 20—30 Minuten in starke Jodjodkaliumlösung. Anders als mit Jodjodkalium fixiertes Moosmaterial wird zuerst in verdünnte Schwefelsäure gebracht und erst nach Auswaschen der Säure in der Jodjodkaliumlösung jodiert. Nach der Jodierung werden die Stämmchen durch Schwenken in verdünnter Schwefelsäure von der anhaftenden Jodjodkaliumlösung möglichst befreit, mit Fließpapier abgetrocknet und in die ½proz. Silbernitratlösung gebracht, bis die Blättchen durch und durch gelblichweiß geworden sind. Die den Blättchen anhaftenden Jodsilberniederschläge werden entfernt, indem man die Stämmchen

in einem Glase mit Wasser schüttelt und unter Wechseln des Wassers so lange fortfährt, bis das Wasser sich nicht mehr milchig trübt. Aufbewahrung in 10- bis 20proz. Glyzerin.

Verfahren von Tröndle[1])

Kleine Stücke des zu untersuchenden Gegenstandes werden in eine kochende starke Lösung von Silbernitrat übertragen und darin etwa 20 Minuten gekocht. Bei Gegenständen mit sehr dicken Plasmodesmen erscheinen sie dann ohne weiteres als starke, schwarze, fein gekörnelte Linien, die in bogigem Verlauf die dicken Zellwände durchsetzen. Bei zarten Plasmodesmen z. B. denen im Parenchym der Rinde von Frangula Alnus ist es nötig, die auf dem Objektträger aufgeklebten Mikrotomschnitte vor Lösung des Paraffins 8—10 Tage im diffusen Tageslicht liegen zu lassen. Bei Untersuchung in verdünntem Glyzerin sieht man diese Plasmodesmen als zarte dunkle Linien in den farblosen Zellulosewänden.

Plasmodesmen sind bei Laub- und Lebermoosen allgemein und oft in sehr großer Zahl verbreitet (Piskernik). Alle Zellen des Blattes hängen miteinander durch Plasmodesmen zusammen.

Bei den Moosen bewährte sich bei Piskernik[2]) am besten folgendes Verfahren: a) 5—10 Minuten gesättigte Jodtinktur (eventuell Jodtinktur + Jodjodkali, 1proz. oder 3proz. Osmiumsäure); b) Auswaschen; c) ca. 5 Stunden in 25proz. Schwefelsäure; d) 5 Minuten oder weniger Gemisch von 25proz. Schwefelsäure + Methylviolett; e) das in 10—25proz. Schwefelsäure unter das Deckglas gebrachte Präparat über der Gasflamme leicht erwärmen und sofort untersuchen.

Erwähnt sei noch die „Rhodankaliummethode“: 5 Minuten warme Rhodankaliumlösung (Gicklhorn), in der die Membranen sehr stark quellen; dann am besten Joddämpfe. Beobachtung in Jodtinktur oder Jodglyzerin.

Bei den Pilzen wurden die Plasmaverbindungen von Chmielewsky (Justs Jahrb., 1888, S. 299) nachgewiesen nach Fixierung mit Pikrinsäure durch Hämatoxylin-Ammoniak. W. Wahrlich (Anat. d. Zelle b. Pilz. u. Alg., Petersburg, 1892) benutzte Jodjodkalium zum Färben und Chlorzinkjod zum Quellen. Die Chlorzinkjod-Wirkung wurde, wenn nötig, durch Erhitzen der Präparate bis zum Auftreten der ersten Bläschen verstärkt. A. Meyer[3]) erzielte bei Volvocineen gute Erfolge mit der Pyoktanin-Methode und bediente sich der Plasmolyse (15 % Salpeter oder Sirup-Wasser, 1 + 1). Mit den Plasmodesmen der Rot- und Braunalgen beschäftigten sich Hick, Schmitz u. a., besonders Wille[4]),

[1]) A. Tröndle, Eine neue Methode zur Darstellung der Plasmodesmen, Verh. schweiz. naturforsch. Ges., 1913, XCVI, S. 213.

[2]) A. Piskernik, Die Plasmaverbindungen bei Moosen, Österr. bot. Zeitschr., 1914, LXIV, S. 107.

[3]) A. Meyer, Plasmaverbind. u. d. Fusionen d. Pilze d. Florideenreihe, Bot. Ztg., 1902, LX, S. 139.

[4]) N. Wille, Beitr. z. Entwicklungsgesch. d. phys. Gewebesystems b. einig. Florideen, Nova Acta, 1887, LII, S. 61.

der sie für sämtliche Zellen der Algen angibt. Cyanophyceen untersuchte Borzi (Le communic. intracell. d. Nostochineae, Malpig., 1886).

Chemotaxis und Chemotropismus

Eine Anzahl chemischer Substanzen bewirken Reizbewegungen, die bei freibeweglichen Organismen als Chemotaxis, bei nicht freibeweglichen als Chemotropismus zusammengefaßt werden. Die Reizbewegung ist entweder positiv (Anlockung) oder negativ (Abstoßung). Die **Chemotaxis** spielt im Leben eine wichtige Rolle (bei Befruchtungsvorgängen u. a.). Es war schon lange bekannt (Ehrenberg, Cohn)[1]), daß auf frei bewegliche Organismen chemische Stoffe einen räumlich orientierenden Reiz ausüben imstande sind, doch erst die „Bakterienmethode" Engelmanns (S. 110) lenkte die allgemeine Aufmerksamkeit auf diese Tatsachen. Grundlegend wurden die Untersuchungen Pfeffers[2]) und die von ihm eingeführte Kapillarmethode. Einseitig zugeschmolzene Glaskapillaren von etwa 1—1,5 cm Länge, deren lichte Weite von der Größe der zu untersuchenden Organismen abhängt[3]), werden unter der Luftpumpe mit der Lösung der zu prüfenden Substanz auf eine bestimmte Strecke hin derart injiziert, daß am zugeschmolzenen Ende noch ein lufterfüllter Raum übrig bleibt. Dieser Raum versorgt die Kapillarlösung mit Sauerstoff und ist besonders bei sauerstoffempfindlichen Organismen von Bedeutung. Beim Füllen der Kapillaren durch Erwärmung würde nicht nur der Sauerstoff verloren gehen, sondern es wären auch Konzentrationsänderungen nicht ausgeschlossen. Die Flüssigkeitssäule in der Kapillare muß mindestens eine Länge von 2 mm haben, wenn man mit Deckglas arbeitet (Lidforss). Die zu prüfenden Organismen kommen auf dem Objektträger in einen Tropfen destillierten Wassers (chemisch rein, frei von Kupfer), dann wird die gefüllte Kapillare hineingebracht (eventuell mit dem Deckglase bedeckt) und beobachtet. Handelt es sich um vergleichende Bestimmungen von Schwellenwerten, dann müssen die Organismen möglichst gleichmäßig in der Lösung verteilt sein.

Die zu prüfenden Lösungen werden tunlichst molekular mit destilliertem Wasser hergestellt (ein Gramm-Molekül im Liter) und dann

---

[1]) Ehrenberg, Die Infusionstiere als vollkommene Organismen, 1838, S. 80 u.; F. Cohn, Unters. üb. Bakterien, Beitr. z. Biol. d. Pfl., 1872, I, S. 142.

[2]) W. Pfeffer, Lokomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize, Unters. Bot. Inst. Tübingen, 1884, I, S. 367 u.: Über chemotaktische Bewegungen von Bakterien, Flagellaten und Volvocineen, ib. 1888, II, S. 648.

[3]) Bei Chytridiaceen-Zoosporen werden Kapillaren mit 67—96 μ, bei Schwärmsporen der Saprolegniaceen mit 105—134 μ, bei Isoetes mit 50—100 μ, bei Bakterien mit 60 μ, bei Marchantia mit 50—150 μ lichtem Durchmesser benutzt.

planmäßig verdünnt. Ist das Molekulargewicht der Substanz nicht bekannt, dann bereitet man kaltgesättigte Lösungen. Den Prozentgehalt dieser Stammlösung bestimmt man durch den Verdunstungsrückstand. Man hat darauf zu achten, daß außer dem Reiz, dessen Wirkung ermittelt werden soll, kein weiterer Reiz in Reaktion tritt. Schon Pfeffer hat auf verschiedene Ursachen mechanischer und physiologischer Natur hingewiesen, welche Fehlerquellen bedingen können. Auch Differenzen im Sauerstoffgehalt erzeugen bei sauerstoffempfindlichen Organismen Aerotaxis, die von der festzustellenden Chemotaxis dann nicht zu unterscheiden ist. Man muß in solchen Fällen mit unbedeckten Präparaten arbeiten und die Versuchsdauer auf wenige Minuten beschränken. Konzentrationsdifferenzen, die durch Verdunstung im Kulturtropfen entstehen, können ebenfalls Chemotaxis hervorrufen. Nach Müller[1]) gilt dies „besonders für die Bestimmungen der Reizunterschiedsschwellen, wo die Außenflüssigkeit den chemotaktisch wirksamen Stoff enthält. Deshalb darf die Versuchsdauer 1—2 Minuten nicht überschreiten". Durch Verdunstung wird die Konzentration des Außenmediums erhöht, es tritt gleichfalls eine Verschiebung der Reizunterschiedsschwelle ein. Das Arbeiten ohne Deckglas empfiehlt sich bei Objekten mit schwachen Bewegungen, denn durch das wiederholte Anstoßen der Schwärmer an das Deckglas wird die Bewegungsenergie schnell geschwächt.

Die gleiche Substanz kann je nach der Konzentration der Lösung anziehend und abßtoßend wirken. Bei einer gewissen Konzentration schlägt die positive Reaktion (Anlockung) in die negative (Abstoßung) um. Diese kritische Konzentration ist bei den verschiedenen Organismen keineswegs die gleiche. Für die chemotaktischen Reizvorgänge gilt das Webersche Gesetz. Wenn sich die Organismen in der Lösung eines Reizmittels befinden, so kann die Anlockung nur durch ein Vielfaches der Konzentration dieses Reizmittels erfolgen. Als Unterschiedsschwelle wird dann das Verhältnis der Konzentration der Lösung bezeichnet, bei der eben noch eine Wirkung wahrnehmbar ist. Diese grundlegenden Gesetze wurden schon von Pfeffer und Stahl[2]) ermittelt.

Seit den Untersuchungen von Voegler[3]), der auch den Einfluß äußerer Faktoren auf die chemotaktische Reizempfindlichkeit studierte, gehen viele Arbeiten auf Ermittelung der Ionenwirkung ein. Nach

---

[1]) F. Müller, Unters. üb. d. chemotakt. Reizbarkeit der Zoosporen v. Chytridiaceen und Saprolegniaceen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1911, XLIX, S. 421.

[2]) E. Stahl, Z. Biol. d. Myxomyc., Bot. Ztg., 1884, XLII, S. 103.

[3]) C. Voegler, Beiträge zur Kenntnis der Reizerscheinungen, Bot. Ztg., 1891, XLIX, S. 641.

Shibata sind bei den Samenfäden der Pteridophyten drei Kategorien chemotaktischer Sensibilitäten zu unterscheiden: 1. die Sensibilitäten der Apfelsäure und der verwandten chemotaktisch wirksamen Dikarbonsäuren; 2. diejenige für OH-Ionen (nur bei Isoetes); 3. diejenigen für die Kationen (Metall- und H-Ionen) und Alkaloide. Die chemotaktischen Sensibilitäten der drei Kategorien sind voneinander gänzlich unabhängig, wie der Mangel der gegenseitigen Beeinflussung zeigt.

Erwähnt seien noch die Befunde von Rothert[1]), der auch den prinzipiellen Verschiedenheiten der von Massart[2]) entdeckten Osmotaxis gegenüber der Chemotaxis nachgeht. Bei verschiedenen Organismen läßt sich die chemotaktische Empfindlichkeit durch Anästhetika aufheben, ohne daß ihre Beweglichkeit beeinflußt wird. Bei den Zoosporen von Rhizophidium pollinis wird die Empfindlichkeit durch Weingeist und Äther aufgehoben, nicht durch Chloroform; bei den Zoosporen von Rh. sphaerotheca wird schon durch 0,003 Mol. Chloroform und durch 0,042 Mol. Äther völlige Aufhebung erzielt. Chloroform und Äther gelangen in am besten frisch bereiteten Lösungen (mit Leitungswasser) zur Anwendung (100 g Wasser bei $17^0 + 6{,}7$ g Äther oder bei $20^0 +$ 0,72 g Chloroform). Diese Lösungen werden entsprechend verdünnt. Dann muß mit der großen Flüchtigkeit der Anästhetika gerechnet werden. Rothert[3]) benutzt daher kleine kalibrierte Zylindergläschen mit flachem Boden (5 cm lang, 5 mm Durchmesser) mit passenden Korkstopfen. Erst wird die Flüssigkeit mit den Organismen bis zur Höhe von 2 cm eingefüllt (mit Kapillarpipette), dann ebensoviel der Narkotikumlösung von der doppelten der gewünschten Stärke und sofort verkorkt. Der Inhalt wird gemischt, die Gläschen werden liegend aufbewahrt. Von dieser Mischung wird ein Tropfen auf den Objektträger gebracht, das Deckglas (durch Deckglassplitterchen gestützt) aufgelegt, die beschickte Kapillare eingeschoben und die zentralen Teile des Präparates geprüft. „Außer Narkotika wirken Elektrolyte schon in schwacher Konzentration stark abstumpfend, die Nichtelektrolyte dagegen erst in höherer Konzentration" (Müller).

Zuweilen bietet die Beschaffung der zu prüfenden Organismen in genügend reinem Zustande und frei von störenden Reizstoffen Schwierigkeiten.

---

[1]) W. Rothert, Beobachtungen und Betrachtungen über taktische Reizerscheinungen, Flora 1901, LXXXVIII, S. 371.

[2]) J. Massart, La sensibilité á la concentration chez les êtres unicellulaires marins, Bull. de l'Ac. Belg., 1891, XXII, S. 152.

[3]) W. Rothert, Über die Wirkung des Äthers und Chloroforms auf die Reizbewegungen der Mikroorganismen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1904, XXXIX, S. 1, und: E. Overton, Studien über die Narkose, Jena 1905.

Stange[1]) und Müller arbeiteten nur mit Spezies-Reinkulturen. Ersterer züchtete Saprolegnia auf Fliegenbeinen und übertrug diese mit in den Versuchstropfen. Dabei sind Fehlerquellen durch, aus den Fliegenbeinen herausdiffundierende, chemotaktisch wirksame Stoffe (Phosphate, Eiweiß) nicht ausgeschlossen. Müller brachte die infizierten Hyphen seiner Spezieskulturen (darüber Origin., S. 429) mittels der Pinzette auf dem Objektträger in einen Tropfen Wasser, bewahrte diesen mehrere Stunden unter der feuchten Glasglocke bis zur Sporangienentleerung auf und prüfte die entlassenen Zoosporen sofort. Für ein Präparat genügen 3—4 große Pseudolpidium-Sporangien, von denen jedes viele Hundert Zoosporen erzeugt. — Auch die Entleerung der Spermatozoiden kann Schwierigkeiten bereiten. Fujii[2]) fand, daß die Mikroprothallien von Isoetes unter Reizwirkung gewisser Bestandteile des Leuchtgases sofort ihre Spermatozoiden entlassen. Daher hielt Shibata[2]) den auf dem Objektträger befindlichen Tropfen Wassers zunächst einige Sekunden über die Mündung eines Kölbchens, das mit Leuchtgas gesättigtes Wasser enthielt. Dann erst werden die Isoetes-Mikrosporen eingetragen, die nun die Spermatozoiden entlassen, nun wird die Kapillare eingelegt, mit dem Deckglas bedeckt und beobachtet.

Anschließend einige Literaturbelege, ohne Vollständigkeit anstreben zu wollen. Die Plasmodien der Myxomyceten werden durch Loheextrakt (Milchsäure) angelockt, fliehen aber Chlornatrium, Glyzerin, Zucker, Salpeter, Kaliumkarbonat (Stahl). Auf Spermatozoiden der Laubmoose wirken 0,001 %) Apfel- und Maleinsäure und ihre Salze positiv. Die Samenfäden von Isoetes, Salvinia und Equisetum werden außer von Apfelsäure auch von neutralen Salzen der Bernstein-, Fumar- und Weinsäure angelockt. Alkaloidsalze wirken in verschiedenem Grade positiv, ebenso freie Alkaloide, wenn sie in genügendem Maße wasserlöslich sind (Colchicin) (Shibata)[3]). Schwächer wirken einige Farbstoffe (Aurantia, Auramin, Methylviolett, Fuchsin). Für die Spermatozoiden von Lycopodium, die sich Apfelsäure gegenüber ebenso wie die Samenfäden von Marsilia vollkommen indifferent verhalten, ist Zitronensäure das spezifische Chemotaktikum (Bruchmann)[4]); nach Stange werden die Myxamöben von Chondrioderma difforme und Fuligo varians von Apfel-, Milch- und Buttersäure, Lohedekokt, Asparagin chemo-

[1]) B. Stange, Chemotakt. Reizbew., Bot. Ztg., 1890, XLVIII, S. 107.

[2]) K. Fujii, Bot. Mag. Tokyo, XXIV, S. 75. — K. Shibata, Untersuchungen über die Chemotaxis der Pteridophyten-Spermatozoiden, Jahrb. f. wiss. Bot., 1911, XLIX, S. 1.

[3]) K. Shibata, Stud. üb. d. Chemotaxis d. Isoetes-Spermatoz., Jahrb. wiss. Bot., 1905, XLI, S. 561 u.: Üb. d. Chemotaxis der Spermatoz. v. Equisetum, Bot. Magazine, 1905, XIX, S. 79 u.: Stud. üb. d. Chemotaxis d. Salvinia-Sperm., Bot. Mag. Tokyo, 1905, XIX, S. 39.

[4]) H. Bruchmann, Von der Chemotaxis der Lycopodium-Spermatozoiden, Flora, 1909, XCIX, S. 193.

taktisch gereizt, während auf die Zoosporen von Saprolegnia freie Phosphorsäure und Salze dieser stark chemotaktisch wirken. Buller[1]) zeigte, daß auf die Farnsamenfäden (Gymnogramme Martensii) außer Wein-, Essig-, Ameisen-, Apfel- und Oxalsäure noch Kaliumsalze und Phosphate in relativ hohen Konzentrationen eine mäßig anlockende Wirkung ausüben. Auch die Metallionen von Kalium- und Rubidiumsalzen wirken positiv.

Lidforss[2]) fand, daß die Spermatozoiden der Marchantiaceen durch Proteinstoffe positiv gereizt werden. Erfolge gaben Albumine, Globuline, Nukleoalbumine, Proteide (Hämoglobin, Nuklein), ferner Fermente (Diastase, Ptyalin). Negativ wirkten Tabakdiastase und Alkalialbuminat (jedenfalls infolge schädlicher Beimengungen). Sie werden ferner von Kaliumsalzen (Reizschwelle bei $^1/_{1000}$ mol.), Rubidium- und Caesiumsalzen prochemotaktisch gereizt. Åkerman[3]) hat Versuche darüber angestellt, ob die Empfindlichkeit für Proteinstoffe durch Kaliumsalze beeinflußt wird. Dies ist nicht der Fall, denn wenn die Außenflüssigkeit 0,1 % Kaliumnitrat, die Kapillarflüssigkeit aber 0,1 % Kaliumnitrat und 0,01 % Hämoglobin enthält, erfolgt eine normale Ansammlung in der Kapillare. Natrium- und Kalziumsalze üben keine chemotaktische Reizwirkung aus, Magnesium- und Ammoniumsalze rufen schwache, Salze der Schwermetalle starke Repulsionserscheinungen hervor.

Bei Zoosporen von Rhizophidium pollinis bewirken genuine Proteinkörper und Fermente Reizbewegungen, bei Schwärmsporen von Rh. sphaerotheca, Pseudolpidium und Saprolegnia mixta außerdem Proteinspaltlinge und bei Saprolegnia-Zoosporen noch Phosphat-Ionen (Müller). Die Schwärmsporen von Chytridium zygnematis werden durch die beim Absterben der Zygnemazellen entstehenden Zerfallsprodukte chemotaktisch gereizt (Rosen)[4]). — Einige Spaltpilze und Flagellaten werden durch gewisse Metallsalze angelockt (Pfeffer). Chromatium Weissii wird durch verdünnte Lösungen von Schwefelwasserstoff, Ammonium- und Kaliumnitrat und Ammonphosphat angelockt, durch konzentrierte Lösungen dieser Stoffe abgestoßen (Miyoshi, Lit. S. 114, 9). Bei Spirillum rubrum und Bazillus „z" (aus Erbsendekokt) wirken

---

[1]) R. Buller, Contributions to our knowledge of the physiology of the spermatozoa of farns, Ann. of Bot., 1900, XIV, S. 543.

[2]) Bengt Lidforss, Über die Reizbewegungen der Marchantiaceen-Spermatozoiden, Jahrb. f. wiss. Bot., 1905, XLI, S. 65.

[3]) A. Åkerman, Über die Chemotaxis der Marchantia-Spermatozoiden, Zeitschr. f. Bot., 1910, II, S. 94.

[4]) F. Rosen, Beitrag zur Kenntnis der Chytridiaceen, 1886, S. 12.

Ammoniumchlorid, -nitrat, Asparagin, Fleischextrakt, Diammoniumphosphat, Dinatrium- und Dikaliumphosphat positiv. Die letzteren beiden aber nur bei Gegenwart von Säure-Ionen[1]).

In sehr lebhafter Bewegung befindliche Organismen kann man zur mikroskopischen Beobachtung im Gesichtsfelde behalten, wenn man auf den Tropfen ein Stückchen Musselin legt und dann erst mit dem Deckglase bedeckt. Die Bewegungen lassen sich auch verlangsamen durch Zusatz einer Lösung von Gummiarabikum (Behrens, Ztschr. wiss. Mikr., 1892, IX, 484) oder von 0,8—1 % Gelatine (Jensen, Biol. Centrbl., 1892, XII, 556).

Die Schwärmer von Polytoma uvella Ehrb. werden durch viele verschiedenen Stoffgruppen angehörige Substanzen angelockt. Die Fettsäuren sind chemotaktisch wirksamer als die Ketone, diese wirksamer als die Alkohole. Mehrbasische Säuren und Alkohole sind unwirksam, auch Zucker. Die optischen Isomeren haben die gleichen Schwellenwerte. Negative Chemotaxis konnte nur durch H- und OH-Ionen hervorgerufen werden. Manche Stoffe, wie Öl- und Buttersäure wirken noch in Verdünnungen, wie sie auf keinem anderen Gebiet der Reizphysiologie bekannt[2]).

Die von Fechner[3]) untersuchte Oscillarie Oscillatoria formosa führt auf chemische Reize hin nur negative (phobische) Reaktionen aus. Besonders stark repulsiv wirken freie Säuren. Die Chemotaxis bei den Oscillarien ist eine Schreckbewegung (Phobotaxis).

H. und E. G. Pringsheim[4]) fanden, daß Leuzin, Phenylalanin und Alanin Vibrionen stark chemisch anlockten. Die Konzentrationsschwelle für die nur künstlich herstellbaren Isomeren erwiesen sich als 100 bis 1000mal so hoch als für die in der Natur vorkommenden. „Diese Überlegenheit der natürlichen Komponente zeigt sich auch darin, daß sie noch bevorzugt wird gegenüber der gleichen oder selbst beträchtlich höheren Konzentration ihres optischen Isomeren".

Der von den Eiern der Fucus-Arten ausgeschiedene phobisch auf die Spermatozoiden wirkende Stoff ist nicht bekannt[5]).

---

[1]) H. Kniep, Chem. v. Bakt., Jahrb. wiss. Bot., 1906, XLIII, S. 215.

[2]) H. u. E. G. Pringsheim u. F. Mainx, Untersuchungen an Polytoma uvella, Ehrb. Planta, 1925, I, S. 583.

[3]) R. Fechner, Die Chemotaxis der Oscillarien und ihre Bewegungserscheinungen überhaupt, Zeitschr. f. Bot., 1915, VII, S. 289.

[4]) H. u. E. G. Pringsheim, Die Chemotaxis von Bakterien gegen optischaktive Aminosäuren, Zeitschr. physiol. Chem., 1916, XCVII, S. 176.

[5]) W. Kotte, Zur Reizphysiologie der Fucus-Spermatozoiden, Ber. deutsch. bot. Ges., 1923, XLI, S. 24.

Chemotropismus: Pollenschläuche werden in ihrer Wachstumsrichtung durch Chemotropismus beeinflußt. Zum Studium desselben sind keimende Pollenkörner (völlig reifer Pollen) erforderlich[1]. Die Pollenkörner einiger Pflanzen (Nicotiana, Lobelia) keimen bereits in Wasser, falls der nötige Sauerstoff zugegen ist. Man kultiviert den Pollen in einem auf dem Objektträger flach ausgebreiteten Tropfen Wasser, bringt den unbedeckten Objektträger in einen dampfgesättigten Raum und stellt von Zeit zu Zeit die Wirkung fest (Lidforss)[2]. Überwiegend treibt der Pollen erst in Zucker-Gelatinelösung Schläuche. Diese Lösung enthält auf 100,0 Brunnenwasser 1,5% Gelatine und 3—30% Rohrzucker. Die erforderliche Zuckermenge ist für die Pollenkörner verschiedener Pflanzen verschieden. Lathyrusarten keimen in Gelatinelösungen mit 15, Ampelopsis hederacea mit 20—30, Päonien mit 1—20, Papaver mit 1, Narcissus, Tulipa und Leucojum mit 2—5% Rohrzucker. Pfundt[3] teilt Minima, Maxima, Optima der Rohrzuckerlösungen für die Keimung von über 100 Pollenarten mit. Frisch geernteter Pollen bildet sowohl in verdünnter als auch in konzentrierter Lösung Keimschläuche, kurz vor dem Absterben aber nur in günstigen Konzentrationen. Ein anderes gutes Substrat, vornehmlich um längere Schläuche zu erzielen, ist Agar. Die Konzentration hängt nach Jost[4] von der Beschaffenheit des Agar-Agar ab. Bei einem schwer löslichen, unreinen Agar sind 0,25—0,50 proz., bei einem leicht löslichen, reinen Agar 1 proz. Lösungen zu verwenden. Gute Dienste leistet eine Lösung mit 1% Zucker und 1% leicht löslichem Agar. Hierbei kommt dem Agar die Rolle eines Nährstoffes nicht zu. Förderung des Wachstums wird in einzelnen

[1] Nach J. Simon läßt sich der Pollen längere Zeit aufbewahren, ohne seine Keimkraft zu verlieren. Der den Antheren entnommene Pollen kommt in kleine mit Watte verschlossene Gläschen, welche in ein größeres Glasgefäß gestellt werden, das luftdicht verschließbar ist und auf dessem Boden unter einer Watteschicht sich wasserfreies Chlorkalzium befindet. (Eine neue Methode zur Aufdewahrung von Blütenstaub in befruchtungsfähigem Zustand, Möllers deutsch. Gärtn.-Ztg., 1910, XXV, S. 11). Hierauf machte schon vorher Pfundt aufmerksam, der zeigte, daß die Lebensdauer des Pollens vom Feuchtigkeitsgehalt der Luft abhängt. Pollen der Herbst- und Frühjahrsblüher zeigen (den Witterungsverhältnissen angepaßt) nur geringe Empfindlichkeit gegen Luftfeuchtigkeit. Bei einigen Anemophilen keimt nur der spontan ausgestäubte Pollen, nicht aber der den geschlossenen Antheren entnommene (Elfing, Stud. üb. d. Pollenk. d. Angiospermen, Jen. Zeitschr. f. Naturw., 1879, S. 1).

[2] B. Lidforss, Biol. d. Poll., Jahrb. wiss. Bot., 1896, XXIX, S. 1.

[3] M. Pfundt, Einfluß d. Luftfeuchtigkeit auf d. Lebensdauer d. Blütenstaubes, Jahrb. wiss. Bot., 1910, XLVII, S. 1.

[4] L. Jost, Selbststerilität einiger Blüten, Bot. Ztg., 1907, LXV, S. 77 u.: Phys. d. Pollens, Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 504.

Fällen durch Zitronensäure bewirkt. Nach Molisch[1]) erfolgt die beste Schlauchbildung bei Rhododendron sp. (12 mm lange Schläuche) auf Agar 1 %, Zucker 5 %, Zitronensäure 0,01 %, nach Jost bei Lilium martagon auf 1 % Agar, 1 % Zucker und 0,01 % Zitronensäure und bei einer Leguminose wirkt 0,002 % Zitronensäure wachstumfördernd. Lopriore[2]) kultiviert Pollen von Araucaria in Birnenabkochung in dunklem Raum bei 25—30°. Pollen von Gramineen, Corydalis cava u. a., die empfindlich gegen Flüssigkeiten sind, werden auf Pergamentpapier ausgesäet und in die feuchte Kammer gebracht (Jost). Es ist bisher in Kultur nur gelungen kurze Schläuche zu erzielen, niemals so lange, wie sie, selbst bei sehr kurzen Griffeln, zur Befruchtung nötig sind.

An wachsenden Pollenschläuchen läßt sich nun der Chemotropismus studieren. Pollenschläuche der Digitalisarten, von Epilobium angustif., hirsutum, Oenothera biennis, glauca, grandiflora, Primula chinensis werden durch Trauben-, Rohr-, Frucht-, Milchzucker, 2 % Dextrin[3]) (Saccharochemotropismus), durch Narbenstücke der betreffenden Pflanze[4]), selbst durch vegetative Teile anderer Pflanzen (Querschnitte von Alliumwurzel) angelockt[5]). In letzteren wirken die Proteine (es wirken nämlich: Diastase [frei von anorganischen Salzen], Albumin aus Eigelb, Konglutin und Globulin aus Pferdeblut, Kasein, Parakasein, Vitellin aus Eigelb, Alkalialbuminat u. a.[6]), Protochemotropismus). Pflanzenstücke werden dem Kulturtropfen mit wachsenden Pollenschläuchen aufgelegt, der Objektträger wird an einen dunklen und feuchten Ort gebracht. Die anderen Reagentien wurden früher mit einer Kapillare dem Kulturtropfen zugeführt; jetzt bringt man (bei Gelatinekulturen) von den Proteinen, die sich sehr langsam lösen, ein kleines Körnchen auf die erstarrende Pollenkultur. Für Zuckerarten wird in der Kultur eine Vertiefung angebracht. Man bringt auf den mit Pollen beschickten Kulturtropfen eine Glasperle, die nach einiger Zeit vorsichtig abgehoben wird. Die Vertiefung des erstarrten Tropfens wird

---

[1]) H. Molisch, Zur Physiologie des Pollens, Sitzgsb. Wien. Akad., 1893, CII$_1$, S. 423.

[2]) G. Lopriore, Vielkernigkeit der Pollenkörner u. Pollenschläuche, Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 335.

[3]) M. Miyoshi, Chemotr. d. Pilze, Bot. Ztg., 1894, LII, S. 1 u.: Reizbew. d. Pollenschläuche, Flora 1894, LXXVIII, S. 76.

[4]) H. Molisch, Ursachen der Wachstumsricht. b. Pollenschläuchen, Sitzgsb. Wien. Akad., 17. I. 1889.

[5]) B. Lidforss, Chemotropismus der Pollenschläuche, Ber. deutsch. bot. Ges., 1899, XVII, 236 u.: Reizbew. d. Pollenschläuche, Zeitschr. f. Bot., 1909, I, 443.

[6]) Die Spaltlinge der Eiweißkörper sind wirkungslos.

mit der betreffenden Zuckerlösung angefüllt. Man kann die, durch den zentrifugal diffundierenden Zucker bewirkten, chemotropischen Krümmungen mikroskopisch verfolgen.

Vgl. dazu H. v. Berg, Beiträge zur Kenntnis der Pollenphysiologie, Planta 1929, IX, S. 105 und P. Branscheidt, Zur Physiologie der Pollenkeimung und ihrer experimentellen Beeinflussung, Planta 1930, XI, S. 451.

Bei Pilzhyphen wurde Chemotropismus 1873 von Pfeffer vermutet. J. Wortmann (Bot. Ztg., 1887, XLV, 812) und A. Fischer (Jahrb. wiss. Bot., 1882, XIII, 304) stellten bei jungen Schläuchen von Saprolegnia Krümmungen nach geeigneten Nährstoffen (Fliegenbeinen, Insektenlarven) fest. M. Büsgen (Bot. Ztg., 1893, LI, 53) führte das Eindringen der Hyphen in die Nährpflanze auf chemische Reize zurück. Grundlegend wurden die Arbeiten von Pfeffer u. Miyoshi[1]).

Miyoshi injizierte Tradescantia-Blätter mit 4 proz. Rohrzuckerlösung, säte die Pollenkörner von Digitalis purpurea mit einem Pinsel gleichmäßig auf die spaltenführende Blattunterseite und brachte die Blätter auf 12 bis 20 Stunden in einen feuchten dunklen Raum. Die Pollenschläuche sind dann stark nach den Spaltöffnungen abgelenkt, und wachsen, meist zu mehreren, durch die Spalten ins Blattgewebe hinein. Es lassen sich zu diesem Versuche auch durchlochte Kollodiumhäute benutzen (s. unt.).

Benutzt werden frisch geerntete Sporen aus Reinkulturen von Mucorarten, Phycomyces, Penicillium, Aspergillus (unter Glasglocke auf sterilisiertem, mit 2proz. Rohrzuckerlösung getränktem Schwarzbrot gezogen), Saprolegnia u. a. Als Membranstücke dienen dünne Glimmerplättchen (10 : 15 mm), Kollodiumhäute (Kollodium mit etwas Mandelöl versetzt, zur Erzielung geschmeidiger Häute), die mit einer sehr feinen Nadel durchstochen werden und die abgezogene spaltenführende Oberhaut der Zwiebelblätter von Allium cepa, sowie lebende Blattstücke (Tradescantia discolor, procumbens); letztere werden mit der betreffenden Lösung unter der Luftpumpe injiziert, bis sie durchscheinend werden, mit Wasser abgespült und mit Fließpapier abgetrocknet. Die Membranstücke gelangen auf eine mit dem Reizstoff versehene Gelatinemasse, auf ihrer Oberseite werden mit einem feinen Pinsel die Sporen ausgesät. Man kann auch die Sporen in Gelatine suspendieren und die sporenführende Gelatinemasse der Oberseite der Häute (der spaltenführenden Blattseite) auftragen. Die Keimung erfolgt in einem dampfgesättigten Raum (Belichtung ist ohne Einfluß). Der Reizstoff diffundiert lang-

[1]) W. Pfeffer, Abh. Kgl. Sächs. Ak., 1893 u.: M. Miyoshi, Chemotr. d. Pilze, Bot. Ztg., 1894, LII, 1 u.: Durchbohrung v. Membranen d. Pilzhyphen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1895, XXVIII, 271. Die Untersuchungen von Miyoshi konnte Fulton nicht bestätigen (Bot. Gazette, 1906, XLI, 81).

sam[1]) durch die künstlichen oder natürlichen Spalten und wirkt auf die wachsenden Schläuche. Chemotropismus erfolgt nach 14—24 Stunden, bei Saprolegnia nach 6—13 Stunden. Positiv wirken 2 % Rohr- und Traubenzucker, Dextrin, Pflaumendekokt, 2 % Fleischextrakt (infolge seines Phosphatgehaltes), Lezithin, Pepton, Ammonphosphat. Negativ wirken alle freien anorganischen und organischen Säuren, Alkalien, Alkohol, einige Salze (weinsaures Kalium-Natrium, Kalisalpeter, Kaliumchlorat, Magnesiumsulfat). Einige Stoffe (1—2 % Glyzerin oder Gummi arabicum) sind wirkungslos. Einige der besten Lockmittel haben kleine Schwellenwerte, sehr kleine Mengen (0,01 % Traubenzucker und 0,05 % Ammoniumnitrat für Mucorarten, 0,005 % Fleischextrakt für Saprolegnia) bewirken bereits deutliche Reizerscheinungen. Traubenzucker wirkt bei Mucor stolonifer bereits in 0,01 % Lösung deutlich, erreicht den Höhepunkt der Wirkung in 2—5 % Lösung, bei 30 % ist die Wirkung nur noch schwach und bei 50 % negativ.

In einfacher Weise kann man Pilzsporen auf eine sterile 5proz. Gelatineschicht aussäen und nach der Keimung auf eine kleine Menge Traubenzucker auf die Gelatineschicht bringen. Der Zucker löst sich langsam, von seiner Lagerungsstelle aus verbreitet sich ein Diffusionsstrom, nach dem sich die wachsenden Schläuche hin krümmen. Reinhardt[2]) legte der Gelatinekultur von Pezizahyphen seitlich ein Gelatinestückchen mit höherem Zuckergehalt an. Die meisten Hyphen bogen unter rechtem Winkel in die zugesetzte Gelatine ein.

Da die wachsenden Hyphen (Penicillium glaucum, Botrytis cinerea) membranlösende Enzyme ausscheiden, so kann man auch spaltenfreie Epidermen (Allium) und undurchlochte Kollodiumhäute, deren Dicke nicht 0,5 mm übersteigen darf, benutzen. Man trägt die mit dem Reizstoff versehene Nährgelatine (3 % Gelatine, 2 % Rohrzucker) in 2—3 mm hoher Schicht auf ein Deckgläschen auf, bedeckt mit dem Kollodiumhäutchen, auf dessen Oberseite in nahrstoffarmer Gelatine die Sporen ausgesät werden. Die Ausführung auf einem Deckgläschen gestattet die Betrachtung des Präparates auf beiden Seiten. Nach 2—4 Tagen haben die Hyphen die Membranen durchbohrt.

Nach Melin (Untersuchungen über die Bedeutung der Baummykorrhiza, Jena 1925) sind es bei den Koniferen Phosphatide, die auf die mykorrhizenbildenden Hymenomyceten reizend wirken und ihr Wachstum katalytisch fördern.

Ursache des radiären Wachstums und damit der Kreisgestalt des in Agar oder Gelatine wachsenden Mycels eines Fadenpilzes ist der negative Chemotropismus gegen eigene Stoffwechselprodukte.

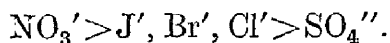
---

[1]) Bei zu schneller Diffusion empfinden die Hyphen keine Konzentrationsdifferenz.

[2]) M. O. Reinhardt, Das Wachstum der Pilzhyphen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1892, XXIII, S. 528.

Die Keimhyphen sind innerhalb einer bestimmten Phase imstande, positiv chemotropische Krümmungen nach Orten höherer Nährstoffkonzentration auszuführen[1].

Für die Reizbarkeit der Tentakeln von Drosera rotundifolia L. gibt Mevius[2] an, daß sich für die K- und Na-Salze hinsichtlich der Stärke der Reizung folgende Reihe aufstellen läßt:

$$NO_3' > J', Br', Cl' > SO_4''.$$

Kalzium-, Baryum- und Strontiumchlorid bewirken, wie schon Darwin gezeigt hat, in keiner Konzentration eine Reaktion der Drosera-blättchen.

Verdünnter Speichel, verdünnter Preßsaft, Salze und Zucker hemmen das Wachstum des Keimblattes des Hafers, unverdünnter Speichel löst auf der Schnittfläche des Keimblattstumpfes sehr starkes Wachstum aus (Seubert)[3].

Intercellularen

Kisser[4] färbt in Fortführung eines von Moll[5] ausgesprochenen Gedankens zur Kenntlichmachung von Interzellularen die in Zelloidin eingelegten Präparate mit Gallaminblau-Borax-Borsäure. Das Zelloidin wird mit einem dunklen schwärzlich-violetten Ton gefärbt, während bei nicht zu langer Einwirkungszeit sämtliche Zellelemente farblos bleiben. Nach Vorbehandlung mit Javellescher Lauge kann man auch mit Anilinblau und Cottonblau färben, die das Zelloidin dunkelblau färben, während die Zellelemente wieder farblos bleiben. Die Schnitte können über Terpentinöl in Kanadabalsam eingeschlossen werden.

IV. Die Zellmembran

Die pflanzlichen Zellwände bauen sich aus verschiedenen chemischen Stoffen auf, unter denen die Polysaccharide an erster Stelle stehen. Zellwände, die frei von (N-freien) Polysacchariden sind, treten seltener auf (Chitinmembran). Von den Polysacchariden kommt in den Membranen nur selten ein einziger Vertreter vor. Meist treffen wir Vertreter verschiedener Gruppen gleichzeitig an. Doch bezeichnet

---

[1]) K. O. Müller, Untersuchungen zur Entwicklungsphysiologie des Pilzmycels, Beiträge z. allgem. Bot., 1921, II, S. 276.

[2]) W. Mevius, Zur Chemonastie von Drosera rotundifolia L., Biochem. Ztsch. 1924, CXLVIII, S. 548.

[3]) E. Seubert, Über Chemotropismus bei Avena, Biochem. Ztschr. 1924, CL, S. 93.

[4]) J. Kisser, Zur Färbung kutinisierter Zellulose-Membranen, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1928, XLV, S. 163.

[5]) J. W. Moll, Die Fortschritte der mikroskopischen Technik seit 1870, Progressus rei botanicae, 1908, II, S. 227.

man in der Mikrochemie eine Membran nach derjenigen Substanz, die für die mikrochemischen Reaktionen bestimmend ist. Wenn daher von „Zellulosemembranen" die Rede ist, so wird damit ausgedrückt, daß die betreffende Zellwand in erster Linie typische Zellulosereaktion gibt.

Die Membranen werden oft von anderen Stoffen durchtränkt. Die auf Wanderung begriffenen Stoffe hat man bisher noch nicht mit Sicherheit in der Membran ermittelt. Viele organische Stoffe (Gerbstoffe, Farbstoffe u. a.) werden von der Membran gespeichert. Vor der mikrochemischen Bestimmung der Membran müssen diese Stoffe unter Umständen entfernt werden. Von anorganischen Stoffen treffen wir vorzugsweise Kalium- und Kalziumsalze und Kieselsäure an. Der Gehalt an gespeicherten Salzen ist oft so groß, daß bei vorsichtigem Glühen der Präparate ein „Aschenskelett" zurückbleibt, das trocken unter Deckglas betrachtet, die Konturen der Zellen zeigt. Das Aschenskelett (s. S. 107) ist zum Teil in Wasser löslich und enthält neben Kalziumsalzen (S. 184) vorwiegend Kaliumverbindungen (S. 168), in bestimmten Fällen Kieselsäure (S. 157).

Alle Membranen, selbst die jugendlichen, sind infolge der Anordnung ihrer Mizellen (Naegeli) doppelbrechend.

Die Theorie von Naegeli[1]), die als Bausteine der Membranen längliche optisch anisotrope kristalline Mizelle fordert, darf nach Frey[2]) in allen ihren Teilen als bewiesen gelten. Mit Hilfe der Stäbchendoppelbrechung kann nämlich nachgewiesen werden, „daß in den Zellmembranen distinkte Zellulosemizellen vorhanden sind, die eine längliche stäbchenförmige Gestalt besitzen müssen. Sie sind stark anisotrop und verhalten sich optisch wie ein rhombischer Kristallit". Die Zellulosemizelle verlaufen in Phloem- und Xylemfasern vollkommen oder annähernd axial; in Siebröhren, Gefäßen und Milchröhren sind sie mehr tangential orientiert. Lignin und Pektinstoffe sind isotrop, während gewisse Hemizellulosen die Doppelbrechung der Zellulose durch ihre eigene Anisotropie überlagern. „Suberin- und Kutineinlagerungen verhalten sich optisch gerade umgekehrt wie die Zellulose; der Grad der Kutinisierung kann daher messend verfolgt werden. Wo Verkorkung, Kutinisierung und doppelbrechende Hemizellulosen fehlen, kann aus der Doppelbrechung von Membranen, sofern sie sich gegenüber Änderungen des Brechungsindex der Imbibitionsflüssigkeit annähernd invariant verhalten, auf die Gegenwart von Zellulose geschlossen werden."

Die spiralige Anordnung der Mizelle liegt wahrscheinlich als allgemeines Prinzip dem Feinbau der Zellmembranen zugrunde.

Die Doppelbrechung der Zellmembranen setzt sich zusammen aus einer starken Eigendoppelbrechung und einer schwächeren vom Brechungsvermögen der Imbibitionsflüssigkeit abhängigen Stäbchendoppelbrechung (Ambronn). Aus letzterer Tatsache folgt das Vorhandensein länglicher Teilchen, aus der Kon-

---

[1]) Carl Naegeli, Die Mizellartheorie. Herausgegeben von Alb. Frey, Ostwalds Klassiker der exakten Wissenschaften (Leipzig, Akadem. Verlagsanstalt, 1928) mit Zusamenfassung und kurzer Geschichte der Mizellartheorie von A. Frey.

[2]) A. Frey, Die submikroskopische Struktur der Zellmembranen, Jahrbücher f. wiss. Bot., 1926, LXV, S. 195.

stanz der Eigendoppelbrechung ergibt sich die Tatsache, daß diese Teilchen optische Konstanten besitzen. Das Auftreten von Kristallinterferenzen im Röntgenbild der Zellmembranen — wie auch der Stärkekörner — beweist das Vorhandensein kristallinischer Teilchen, d. h. kristalliner Mizelle im Sinne Naegelis.

Die intermizellaren Räume sind gewöhnlich von Kolloidstoffen erfüllt, bei jugendlichen Membranen von Pektin, bei der Zellulosefaser von amorpher Zellulose, bei kutinisierten und verkorkten Membranen von Kutin- und Suberinsubstanzen, bei Holz durch Lignin.

Für die Existenz der Mizellen spricht weiter der Dichroismus der von Ambronn und Frey erzielten Metallfärbungen in Fasern. Da die Metallkriställchen, um die es sich hier handelt, isotrop sind, so folgt daraus, daß die Ausmaße der Intermizellarräume nach verschiedenen Richtungen verschieden sind[1]).

Das Mizell Nägelis ist ein Kristallit, ein Gitter aus ungleich langen Makromolekülen (Makromolekülgitter) (Staudinger u. Signer).

Die Kristalleigenschaft der Zellulosemizelle geht auch daraus hervor, daß die Pflanzenfasern nach dem Debye-Scherrer-Verfahren Kristallinterferenzen liefern (Scherrer).

Die intermizellaren Räume der Membran besitzen Durchmesser von der Größenordnung 10^{-6} cm (Frey)[2]).

Von unseren heutigen Kenntnissen des Baus der Zellmembranen gibt Frey[3]) folgendes Bild:

Der wichtigste Bestandteil der Zellwände, zugleich der Träger ihrer Anisotropie ist die Zellulose. Die Mizelle der Zellulose (s. S. 898) werden durch vorläufig nicht näher bekannte Kräfte zu Mizellverbänden oder Mizellaggregaten vereinigt. Bei den Fasern sind die kleinsten mikroskopisch sichtbaren Mizellarverbände die Fibrillen. Sie können durch Verquellen oder geeignete Gärungsprozesse voneinander getrennt werden und besitzen Fadenstruktur. Die Fibrillen finden sich vor allem in faserartigen Zellen und zeigen bereits alle anisotropen und chemischen Eigenschaften (z. B. Verholzung) der fertigen Membran. Die Fibrillen wiederum sind in Schichten angeordnet. Die Schichten endlich, die durch Einlagerung von Pektin, Kutin usw. mikrochemisch ganz verschieden reagieren können, setzen die Membran zusammen. Eine Zellfaser setzt sich also folgendermaßen aus einer ganzen Stufenleiter von einander untergeordneten Bauelementen zusammen: Zellulosehauptvalenzketten→Mizell→Fibrillen→Membranschicht→Zellwand.

---

[1]) A. Frey, Der heutige Stand der Mizellartheorie, Ber. deutsch. bot. Ges., 1926, XLIV, S. 564; s. a. C. Steinbrinck, Über den heutigen Stand der Mizellartheorie auf botanischem Gebiete, Biolog. Zentralbl., 1925, XLV, S. 1.

[2]) A. Frey, Der submikroskopische Feinbau der Zellmembranen, (Referat), Naturwissenschaften, 1927, XV, S. 760.

[3]) A. Frey-Wyssling, Mikroskopische Technik der Mizellaruntersuchung von Zellmembranen, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1930, XLVII, S. 1.

Durch Quellungsmittel wird Wasser zwischen die Mizelle gelagert. Die dabei zu beobachtenden optischen Erscheinungen weisen darauf hin, daß die Mizelle durch Einlagerung der Quellungsmittel „leicht desorientiert werden und von ihrer Parallellagerung etwas abweichen".

Die Eigenschaft anisotroper Objekte, nach Aufnahme von Farbstoffen Dichroismus zu zeigen, ist von Frey[1]) dazu benützt worden, Fasern dichroitische Metallfärbung zu verleihen. Als Beispiele seien eine Silber- und Kupferfärbung angegeben.

Ein kleines Büschel Fasern wird so zurechtgeschnitten, daß es bequem auf einem Objektträger Platz findet. Man tränkt in zweiprozentiger Silbernitratlösung, trocknet mit Fließpapier sorgfältig ab, setzt sie kurz dem Licht aus und bringt sie, ehe sie sich verfärben, in Glyzerin. In diesem erwärmt man sie auf dem Objektträger oder in einem Probierröhrchen so, daß das Glyzerin nicht siedet. Man erwärmt so lange, bis eine Probe in der einen Richtung ein tiefes Indigoblau (positiv dichroitisch) und senkrecht dazu ein sattes Gelb (negativ dichroitisch) erkennen läßt.

Für die Kupferfärbungen werden die Fasern ½ Stunde in konzentrierte Kupfersulfatlösung gelegt, gut abgetrocknet und auf dem Objektträger mit einem Tropfen konzentrierten Hydrazinhydrats benetzt. Erwärmt man dann über dem Mikrobrenner auf dem Objektträger bis zur Schwärzung, so entsteht der Dichroismus smaragdgrün (positiv dichroitisch) — schmutzigrot (negativ dichroitisch).

Trotz mancher Fortschritte ist die Membranchemie nicht völlig geklärt (zumal bei verschiedenen makrochemischen Untersuchungen offenbar Inhaltsstoffe mit verarbeitet worden sind), so daß hier nur eine mikrochemische Charakteristik der hauptsächlichsten Pflanzenmembranen gegeben werden kann. Einleitend soll in Kürze auf die Ansichten über das Wachstum der Membran und ihre feinere Struktur eingegangen werden.

Die Zellwand gilt als eine Ausscheidung des Plasmas (Straßburger, van Wisselingh). Über die Rolle des Kerns bei der Membranbildung herrschen Meinungsverschiedenheiten. Klebs sagt: „ohne Kern keine Membranbildung" und Haberlandt weist darauf hin, daß der Kern sich oft an der Stelle einseitiger Wandverdickung befindet. Nach Palla sollen an kernfreien Plasmastücken ebenfalls Membranbildungen auftreten, ein Befund, den Pfeffer und Townsend auf feine Plasmastränge zurückführen. Strumpf stellt die Bedeutung der Kerne bei der Membranbildung ganz in Abrede. Auffallend ist aber die Tatsache, daß bei vermehrter Zellulosebildung die Kerne sich häufig durch ihre Größe auszeichnen und amitotische Zustände zeigen (Mykorrhizen bei Orchideen, W. Magnus, Zellulosebalken im Embryosack, Tischler, Buscalioni). van Wisselingh denkt sich den Einfluß des Kerns auf das Wachstum als einen indirekten.

Die primäre Pektinlamelle entsteht nach Dembowski u. Ziegenspeck[2])

---

[1]) A. Frey, Die Technik der dichroitischen Metallfärbungen, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1925, XLII, S. 421.

[2]) Dembowski u. Ziegenspeck, Über die Entstehung der primären Pektinlamelle bei der Zellteilung, Bot. Arch., 1929, XXIV, S. 492.

folgendermaßen: Von den durch die Kernteilung gebildeten Tochterkernen werden stark färbbare Gelmassen abgegeben. Beim Zusammentreffen und Verkleben der beiden Massen im Äquator der Zelle verlieren sie ihre Färbbarkeit und schrumpfen gleichzeitig zusammen. Die Körnchen an den Spindelfasern sind die ersten Verdichtungen. Allmählich verschmelzen die Körnchen durch seitliches Zusammenfließen und bilden so die Pektinlamelle der Zelle.

Eine Spaltung der angelegten Lamelle in zwei Häute und nachfolgende Einlagerung von Zellulose oder Pektin konnte nicht beobachtet werden. Ebensowenig entsteht die Mittellamelle durch Verkleben von zwei Wänden.

Da nach einer Annahme von Strasburger die Zellhaut aus dem Plasma entstehen sollte[1]) so war es naheliegend, daß man in den Zellhäuten nach Eiweißsubstanzen suchte und besonders Wiesner[2]) nahm Protoplasma in der Membran an und gab Eiweißreaktionen für meristematische und ausgewachsene Gewebe, Krabbe[3]) für Sklerenchymfasern an. Krasser[4]) suchte die Ansicht mit der Alloxanmethode (S. 672) zu stützen. Klebs, A. Fischer[5]) und Correns (Lit. S. 671, 5) verneinen einen Eiweißgehalt der Membran. Mit Millon (kalt) werden alle unverholzten Membranen der Bromeliaceen rot, nur jugendliche Wände reagieren nicht. Der reagierende Stoff ist gleichmäßig verteilt, besonders aber in der Mittellamelle. Die Reaktion tritt auch in Schnitten ein, die 6 Tage mit Glyzerin-Pepsin oder -Pankreatin (zur Lösung des Eiweiß) behandelt waren. A. Fischer, Correns und Saito nehmen Tyrosin an. Krasser hatte jedoch vor der Behandlung mit Millon die Schnitte mit Wasser ausgekocht. Der reagierende Stoff ist noch unbekannt und jedenfalls kein Eiweiß, wahrscheinlich auch kein Tyrosin. Besonders in der Mittellamelle liegen noch unbekannte (aromatische) Körper vor. Wo Schwefelsäure verholzte Wände rötet, da beginnt die Färbung in der Mittellamelle, um von dort auf die anderen Lamellen überzugehen.

Zum Nachweis von Eiweiß in Zellwänden chloriert sie Wood[6]) und weist das aus dem Eiweiß gebildete Chloramin mit Jodkali nach. Reine

---

[1]) Auch Tupper-Carey u. Priestley nehmen an, daß die Stoffe der Zellwände aus dem lebenden Protoplasma hervorgehen.

[2]) J. Wiesner, Organis. d. vegetab. Zellhaut, Sitzgsb. Wien. Ak., 1886, XCIII, 1, Sep. u.: Nachweis der Eiweißkörper, Ber. d. bot. Ges., 1888, VI, 187.

[3]) G. Krabbe, Veg. Zellmembran, Jahrb. f. wiss. Bot., 1894, XXVI, 637.

[4]) F. Krasser, Lit. S. 672 u.: Mikrochem. Nachweis von Eiweiß in d. pfl. Zellhaut, Bot. Ztg., 1888, XLVI, 209.

[5]) G. Klebs, Krit. Bem. z. Arb. von Wiesner, Biol. Centralbl., 1886, VI, 449 u.: Bem. z. Arb. v. Krasser, Bot. Ztg., 1887, XLV_2, 697. — A. Fischer, Z. Eiweißreakt. d. Zellmemb., Ber. d. bot. Ges., 1887, V, 423 u. 1888, VI, 113.

[6]) F. M. Wood, Further investigations of the chemical nature of the cell-membrane, Ann. Bot., 1926, XL, S. 547.

Zellulosewände sind proteinfrei; mehr als 0,001 % Eiweiß wurde nie gefunden.

Hierzu sei ein Befund von Aisslinger[1]) erwähnt, der an der Spitze der Fasern von Crotalaria juncea, Parkia africana und Pueraria thunbergiana fand, „daß zuweilen die Verdickungsschichten sich nicht lückenlos aufeinanderlegen, sondern freie Räume zwischen sich lassen, in denen sich zuweilen Plasma findet". Mikrochemische Einzelheiten fehlen. Weitere Prüfungen in dieser Richtung sind anzuraten. Wahrscheinlich eignet sich hierzu eine entwicklungsgeschichtliche Untersuchung der sog. Doppelhaare[2]).

Die oben erwähnten aromatischen Einlagerungen in unverholzten Membranen lassen sich durch die Diazo- und Nitritreaktion von Raciborski[3]) nachweisen, Reaktionen, die an einem großen Material systematisch erprobt werden sollten. Die Schnitte gelangen für die Nitritreaktion in 10proz. Natriumnitrit, dann auf höchstens 1 Minute in 10proz. Schwefelsäure und schließlich in 10—20proz. Natriumkarbonat. Der vorzugsweise in der Mittellamelle entstehende Farbstoff ist haltbar, in Weingeist unlöslich und läßt Anfertigung von Dauerpräparaten zu. Umständlicher ist die Diazoreaktion, weil die Herstellung einer frischen Diazolösung[4]) jedesmal erforderlich ist. Bei dieser werden die Präparate in einem Uhrgläschen in etwa 10—20proz. Natriumkarbonat gebracht und einige Tropfen Diazolösung aufgetropft. Auch hierbei entsteht die Färbung sofort, ist haltbar und gut lokalisiert.

Die Anwesenheit von Plasma in der Zellwand ist die Voraussetzung von Wiesners Dermatosomentheorie (Lit. S. 888, 2). Die Hauptmasse der Zellwand soll aus kleinen, runden organisierten Gebilden bestehen (Dermatosomen), die, so lange die Zellwand wächst, durch feine Plasmastreifen verbunden sind. Die Dermatosomen, die aus Mikrosomen des Protoplasmas (Plasomen) hervorgehen

---

[1]) H. Aisslinger, Beitr. z. Kennt. wenig bekannter Pflanzenfasern, Diss. Zürich 1907, S. 45.

[2]) H. Solereder, Deckhaare d. Pimentfr. u. d. Myrtaceen, Arch. d. Pharm., 1907, CCXLV, S. 410 u.: O. Tunmann, An. Unt. von Eugenia apiculata m. bes. Berücks. d. Sekretbeh. u. Trichome, Pharm. Zentralh., 1909, L, S. 894.

[3]) M. Raciborski, Beiträge zur botanischen Mikrochemie, Bull. de l'Acad. de Cracovie, 1906, S. 553.

[4]) Die Lösung hält sich nur wenige Stunden, Raciborski gibt folgende Vorschrift: „etwa 0,2 g p-Nitroanilin (oder Sulfanilsäure oder eine der Naphthylaminsulfosäuren) wird mit etwas größerer Menge Salzsäure versetzt. Dazu wird dann Wasser zugesetzt, mit Eisstücken gut gekühlt, und schließlich wird dazu unter fortwährendem Rühren soviel Natriumnitritlösung zugesetzt, bis die Probe auf Jodkalistärkepapier eben die blaue Jodreaktion liefert. Die Lösung soll mit Natriumkarbonat keine rote Reaktion geben".

sollen, weist er mit dem „Zerstäubungsverfahren“ nach. Die Objekte werden auf 24 Stunden in einer 1proz. Salzsäure belassen und nach Absaugen der anhaftenden Flüssigkeit auf 50—60° (kleinere Objekte auf 30—50°) erwärmt. Durch leichten Druck lassen sich dann die Membranen in ein höchst feines Pulver zerreiben. Versuchsobjekte sind: Lein-, Hanf-, Jutefasern, meristematische Gewebe, Holz (Tilia, Pinus), Parenchym (Kartoffel, Holundermark). Die Zerstäubung bei dem starkwandigen Endosperm von Phytelephas gelingt erst nach monatelanger Salzsäurebehandlung, *gar nicht* bei Hyphen verschiedener Polyporus-Arten und beim Kork. Die Zerfallsprodukte verholzter Membran geben Ligninreaktion, die von Zellulosemembranen Zelluloserekationen. — Diese Theorie hat wenig Zustimmung gefunden. Pfeffer (Energetik, Sächs. Ak. Abh., 1892, XVIII, 151) konnte künstliche Zellulosehäute (Kollodium) in Dermatosomen zerlegen. Die Dermatosomen hält Fischer für Zertrümmerungsprodukte, Zimmermann für die dichtesten Partien der Membranen, Correns für vorgebildet.

Nach Hansteen-Cranner[1]) stellen die lebenden Zellwände aller Zellen ein kolloides Netzwerk dar, dessen festes Gerüst aus Zellulose und Hemizellulosen gebildet ist, dessen Maschen aber sämtliche Phosphatide der plasmatischen Grenzschichten enthalten. Durch Einlagerung dieser reaktionsfähigen Phosphatide ist die junge Zellwand nicht mehr als ein nur mechanisches, sondern vielmehr als ein lebendes physiologisch wirksames Organ anzusehen. Die Zellwände sollen wegen ihres Phosphatidgehalts bei der Regulation des Stoffaustausches mitbeteiligt sein, also dem Zellkörper auch einen physiologischen Schutz geben und deshalb den lebenden Zellorganen zugerechnet werden.

Vgl. dagegen F. C. Steward, Phosphatides in the limiting protoplasmic surface, Protoplasma, 1929, VII, S. 602.

Um die Zellwand unter Erhaltung aller ihrer Stoffe, insbesondere der Lipoide von Zellinhaltsbestandteilen zu trennen, verfuhr Hansteen-Cranner[2]) folgendermaßen: Das in einem Porzellanmörser möglichst fein zerriebene Material — lebende beim Stoffaustausche stark tätige Parenchymgewebe — wurde mit großen Mengen von kaltem und kalkreichem, aber sonst sehr reinem Leitungswasser wiederholt und anhaltend ausgerührt. Nach mehrstündigem Stehenlassen wurde das von schwebenden Zellinhaltsstoffen stark getrübte Wasser abgegossen, der Bodensatz noch einmal in derselben Weise mit Wasser gewaschen. Die Gewebemasse wurde nun wiederum im Mörser so lange fein zerieben, bis zahlreiche Proben im Mikroskop nur ganz zerquetschte Zellen erkennen ließen. Dann wurde die Masse möglichst fein und gleichmäßig in großen Mengen kaltem Leitungswasser verteilt und die Mischung zugleich zentrifugiert. Die in der Zentrifuge zurückbleibende Masse wurde wiederum im Mörser behandelt, mikroskopisch untersucht, in großen Mengen Wasser ausgerührt, zentrifugiert und dieses Verfahren so oft wiederholt, bis das jedesmal abgeschleuderte Wasser nicht mehr trübe, sondern

---

[1]) B. Hansteen-Cranner, Untersuchungen über die Frage, ob in der Zellwand lösliche Phosphatide vorkommen, Planta, 1926, II, S. 438.

[2]) B. Hansteen-Cranner, Über das Verhalten der Kulturpflanzen zu den Bodensalzen. III. Beiträge zur Biochemie und Physiologie der Zellwand lebender Zellen, Jahrbücher f. wissenschaftl. Bot., 1914, LIII, S. 536.

ganz klar war, und bis eine genaueste mikroskopische Untersuchung der in der Zentrifuge zurückbleibenden Substanzmasse ergab, daß diese nur aus ganz reinen Zellwandfragmenten bestand. Sie dürfen mit Chlorzinkjod keine blau-gelb- oder braungefärbte, mit Alkannatinktur keine rotgefärbten Zellinhaltsbestandteile erkennen lassen.

Die Meristemwände der radicula- und Wurzelspitze bestehen nach Tupper-Carey und Priestley[1]) hauptsächlich aus einem Eiweiß-Pektin- und einem Eiweiß-Zellulose-Komplex, in dem die Zellulose noch mit Fettsäuren und eventuell locker mit Pektin verbunden ist. Die Meristemwände der Plumula enthalten den Protein-Pektin-Komplex verbunden mit einem Zellulose-Pektin-Fettsäure-Komplex. Weiteres ist aus folgender Übersicht zu ersehen:

	Meristem				Ausgewachsenes Parenchym	
	radicula u. Wurzel	Plumula	Etiolierter Sproß	Grüner Sproß	Etiolierter Sproß	Wurzel und grüner Sproß
Zellwand	Protein-Pektin | Zellulose | Fettsäuren	Pektin-Protein | Zellulose ? | Fettsäuren	Pektin | Zellulose | Fettsäuren	Pektin | Zellulose und Fettsäuren oder Seife	Pektin | Zellulose und Fettsäuren oder Seife	Pektin | Zellulose und Fettsäuren oder Seife
Mittel-Lamelle	Protein | Pektin	Protein | Pektin	Protein | Pektin	Protein | Pektin	Pektin | Fettsäuren	Kalziumpektat und Kalziumseife

Beim Studium über das **Wachstum** der Zellwände ist es vorteilhaft, die neugebildeten Membranlamellen von den älteren mit Sicherheit unterscheiden zu können. Hierbei muß naturgemäß in erster Linie dafür gesorgt werden, daß die Lebenstätigkeit der membranbildenden Zellen nicht gestört wird. Das kann auf verschiedene Weise erreicht werden.

So läßt sich Neubildung von Membranen bei jenen Pflanzen beobachten, bei denen der Plasmakörper nach erfolgter Plasmolyse durch konzentrierte Zuckerlösung nicht zugrunde geht[2]). Das beste Versuchsobjekt ist Vaucheria[3]); hier tritt in 10proz. Glykoselösung Neubildung der Zellhaut bereits innerhalb 1 Stunde ein. Weitere Objekte bilden

[1]) R. M. Tupper-Carey and J. H. Priestley, The composition of the cell-wall at the apical meristem of stem and root, Proceed. Roy. soc. London B, 1923, XCV, S. 109.

[2]) G. Klebs, Beitr. z. Phys. d. Pflanzenzelle, Unt. bot. Inst. Tübingen, 1888, II, 489.

[3]) Schon von E. Strasburger benutzt (Stud. üb. Protoplasma, Jen. Zeitschr. f. Naturw., 1876, X, 415).

Zygnema-, Mesocarpus-, Oedogonium-Arten. Die Blattzellen von Funaria und Helodea brauchen 8—10 Tage zur Neubildung. Gute Resultate liefern gekochte und filtrierte Lösungen von 16—20 % Rohrzucker und 10 % Glykose, in denen sich Pilze und Bakterien zu langsam entwickeln, um störend zu wirken. Zusatz von 0,01 % Kongorot[1]) zur Zuckerlösung läßt die neugebildete Wand gleich bei der Entstehung scharf hervortreten. Der Farbstoff stört nicht die Lebenstätigkeit der Zellen, fördert das Dickenwachstum und bringt das Flächenwachstum zum Stillstand.

In ähnlicher Weise wurden von Noll (Lit. S. 805, 1) bei Meeresalgen Eisenfärbungen der Membran erzeugt, ohne die Lebenstätigkeit der betreffenden Algen zu schädigen. Die bei weiterer Kultur sich neubildenden Membranen sind farblos und die ursprünglich gefärbten nehmen bei weiterem Wachstum durch Intussuszeption eine hellere Färbung an. Die Algen gelangen auf einige Sekunden in eine Mischung von 1 Seewasser + 2 Süßwasser, dem soviel Ferrocyankalium zugefügt ist, daß das spezifische Gewicht der Mischung dem des Seewassers gleicht (1,026). Die Algen werden darauf durch reines Seewasser gezogen und kommen auf 2 Sekunden in ein frisch bereitetes Gemisch von 2 Seewasser + 1 Süßwasser nebst einigen Tropfen Ferrichlorid. Das Verfahren kann zur Erzeugung stärkerer Farben einige Male wiederholt werden. Alle Membranschichten sind jetzt gleichmäßig durch Berlinerblau gefärbt. Doch verschwindet die Färbung durch Alkaliausscheidung allmählich, läßt sich aber durch Eintauchen der Algen in eine mit Salzsäure angesäuerte Lösung von Ferrocyankalium wiederum hervorrufen. — Mit Ferricyankalium und milchsaurem Eisenoxydul läßt sich Turnbulls Blau speichern.

Viele Membranen zeigen keinen homogenen Aufbau, sondern lassen bei genauer Betrachtung **Differenzierungen** mehr oder weniger ohne weiteres erkennen. Bei geschichteten Membranen heben sich die einzelnen Schichten durch ihr verschiedenes Lichtbrechungsvermögen scharf voneinander ab. Besonders klar tritt der Membranaufbau an Mikrotomschnitten hervor (5 μ Dicke, Strasburger). Bei Einwirkung von Quellungsreagentien (Alkalien, Chloralhydrat, Jodquecksilberjodkalium, Chromsäure) zeigen manche Schichten, daß sie aus feinen Lamellen bestehen. Außer Schichtung unterscheidet man spiralige Streifung und Querlamellierung, die sich durch die genannten Reagentien ebenfalls deutlicher (oft allerdings nur vorübergehend) sichtbar machen lassen. Die Differenzierungen können nach Correns (Lit. S. 827, 2) be-

[1]) Kongorot wurde bei Chara foetida (Rhizoiden) u. Lepidium (Wurzeln) von Zacharias benutzt (Wachst. d. Zellhaut b. Wurzelhaaren, Flora, 1891, LXXIV, 467), Einwirkung 30 Min.

gründet sein: in der Membranskulptur, in einem sprungweise wechselnden Wassergehalt der Streifen und Schichten bei gleicher chemischer Zusammensetzung, bei gleichem Wassergehalt in chemischer Verschiedenheit und schließlich in einem ungleichen Wassergehalt und in chemischen Abweichungen.

Membrandifferenzierungen, die nur auf ungleichem Wassergehalt beruhen, müssen sich durch Austrocknen der Objekte zum Schwinden bringen lassen. Durch wasserentziehende Reagentien (absoluter Alkohol) läßt sich die Feuchtigkeit nicht vollständig entziehen, das Austrocknen muß im Trockenschrank bei 60—100° vorgenommen werden. Bei der Austrocknung tritt zuweilen eine Gestaltsveränderung ein. Die Wirkung des Austrocknens wird an Vergleichspräparaten festgestellt, die entweder trocken unter Deckglas gebracht oder in Kanadabalsam untersucht werden, welcher nahezu den gleichen Brechungsindex wie die Zellwand besitzt. Correns benutzt zum Nachweis Silber- und Eisensalze. Diese werden von den wasserreichen Schichten am reichlichsten aufgesaugt. Die aufgenommenen Metalle werden fixiert. Versuchsobjekte: mit Wasser ausgewaschene Bastfasern von Nerium und Vinca. Versilberungsverfahren S. 827 (2% Silbernitrat, leicht abtrocknen, 0,75 Kochsalz, Wasser, Belichtung). Berlinerblaureaktion: Die gut ausgewaschenen Schnitte werden bei 100° getrocknet, dann 10proz. Ferrocyankalium (einige Minuten), oberflächliches Abwischen, verdünntes Ferrichlorid (einige Sekunden), Austrocknen, Kanadabalsam.

Beruhen Membrandifferenzierungen auf chemischen Ursachen, so bleiben Streifen und Schichten nach dem Austrocknen in gleicher Schärfe sichtbar. Zur Färbung kann Bismarckbraun dienen (konzentrierte Lösung in 70proz. Weingeist, Einwirkung 20—30 Minuten, abs. Alkohol, Xylol, Balsam). Meist wird zugleich mit chemischen Differenzen ein ungleicher Wassergehalt verbunden sein. Durch beide Faktoren kommt nach Correns die Querlamellierung der Bastfasern zustande. Die radial laufenden Lamellen sind gewöhnlich stark lichtbrechend und bleiben in Methylenblau farblos, während sich die übrige Membran stark färbt. Durch Kaliumchlorat-Salpetersäure wird die starke Lichtbrechung der Querlamellen aufgehoben und die Membran nimmt Methylenblau nun gleichmäßig an. Wahrscheinlich ist der die Lamellierung bedingende Stoff durch das Mazerationsgemisch herausgelöst worden. Die Streifung der Epidermiswände bei Hyacinthus und Ornithogalum nutans sowie die schräge Streifung der Bastfasern[1]) soll

[1]) Diagnostisch wichtig. Bei Linum bilden die Streifen mit der Längsachse der Faser einen Winkel von 10°, 21, bei Cannabis nur von 3°, 66 (P. Sonntag, Ber. bot. Ges., 1911, XXIX, 669).

nach Correns auf einem ungleichen Wassergehalt der einzelnen Schichten beruhen. Manche Bastfasern besitzen eine feine spiralige Streifung, die aber beim Austrocknen deutlicher hervortritt. Ähnliches sehen wir bei Trichomen (Penghawar Djambi). Werden ausgetrocknete Haare mit der Nadel verletzt, dann reißt die Membran in der Richtung der Streifen ein und die gesamte Wand rollt sich spiralig auf. Die gleiche Erscheinung erzielt man mit konzentrierter Kalilauge oder mit anderen stark quellend wirkenden Reagentien. Hier zeigt die Streifung die Richtung der spiralartig angeordneten Membranlamellen an (Tunmann, Lit. S. 150,4).

Derartige Erscheinungen lassen sich diagnostisch verwerten. Weizenhaare zeigen beim Einlegen in konzentrierte Salzsäure (spez. Gew. 1,19) oder in 50proz. Kalilauge Spiralbildung, nicht aber die Haare von Roggen, Einkorn und Gerste. Rosenthaler[1]) führt diese Eigenschaft bei Triticum auf chemische Ursachen zurück. Andererseits kann vorhandene Streifung durch Einwirkung ganz bestimmter Reagentien zum Schwinden gebracht werden, die Streifung der Fasern von Pouzolzia verschwindet nur bei Einwirkung von Kupferoxydammoniak, die der Boueafasern nur durch Kalilauge (Aisslinger, Lit. S. 889,1).

Die Außenwände der Oscillarien zeigen Netzstruktur (Kolkwitz) erst nach Vorbehandlung und Färbung. Correns[2]) behandelt das Material nacheinander mit Pepsin-Glyzerin-Salzsäure, Chromsäure, 2proz. Kalilauge und färbt mit Karbolfuchsin. Bei weit geöffneter Irisblende sieht man ein rotes Netz auf farblosem Grunde.

Über die Verteilung der einzelnen Membranstoffe innerhalb der Zellwand haben neuere Arbeiten weiteren Aufschluß gebracht. In den Endospermzellen der Steinnuß bildet Zellulose den Kohlenhydrat-Bestandteil der inneren tertiären Lamelle, die beiden Mannane treten nur in den äußeren Schichten auf, in den xylanhaltigen Zellen des Parenchyms der Bambushalme ist die Zellulose wieder in der tertiären Lamelle, das Xylan in einer Außenlamelle.

Allgemein steht beim Aufbau der Zellmembran mit der Schichtung eine stoffliche Differenzierung in engem Zusammenhang (Hess)[3]).

Aus den Beobachtungen, die Lüdtke (l. c. S. 906, 4) an Bambusfasern machte, insbesondere aus dem perlschnurartigen Aufquellen der Fasern in Kupferammin-

---

[1]) L. Rosenthaler, Verhalt. d. Haare einig. Getreidearten gegen Salzsäure, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1910, XX, S. 339.

Über die Spiralstreifung bei den Haaren des Baumwollsamens s. W. L. Balls, Proceed. royal. soc. Ser. B, 1923, XCV, S. 72.

[2]) C. Correns, Über die Membran und die Bewegung der Oscillarien, Ber. deutsch. bot. Ges., 1897, XV, S. 139.

[3]) K. Hess, Zur Frage des Aufbaues pflanzlicher Membranen, Biochem. Zeitschr., 1928, CCIII, S. 409.

lösung schließt er „daß jede Innenschicht genau so wie die ganze Faser von einer Haut umgeben ist und daß die Innenschichten genau wie die unmittelbar unter der Außenhaut folgende erste Schicht in regelmäßige in Richtung der Faser aufeinanderfolgende Einheiten unterteilt sind."

Möglicherweise sind dann auch noch kleinere Einheiten, die vielleicht aus Zellulosekristallen (s. S. 898) aufgebauten Fibrillen, gegeneinander durch ein System von Zwischenhäuten abgegrenzt.

E. Schmidt[1]) beurteilt die Zellmembranen auf Grund ihres Verhaltens zu Chlordioxyd. Dadurch werden wasserunlösliche Bestandteile in wasserlösliche Umsetzungsprodukte übergeführt, die aus Oxydationsprodukten des von Chlordioxyd angreifbaren Membran-Bestandteils und aus Kohlenhydraten bestehen. Behandelt man danach mit Natriumsulfit, so werden die auf der Faser verbliebenen wasserunlöslichen Oxydationsprodukte in lösliche Form übergeführt. „Demnach erweist sich die pflanzliche Zellmembran, in großen Zügen betrachtet, als ein zwiefacher Ester, deren Alkohol in der Skelettsubstanz die Zellulose bzw. das Chitin, in der Inkruste der von Chlordioxyd angreifbare Membran-Bestandteil ist." Diese Auffassung steht offenbar im Gegensatz zu der von Lüdtke, der sowohl chemische Bindung wie Adsorption zwischen Lignin und Zellulose ablehnt.

Durch Zusatz von Pyridin und Phosphatpuffer von pH = 6,8 zum Chlordioxyd lassen sich die Skelettsubstanzen der inkrustierten pflanzlichen Zellwände im „Einstufen-Verfahren" darstellen. Dadurch konnte ermittelt werden, daß in der Skelettsubstanz der Rotbuche ein Xyloseanhydrid im schwerlöslichen Xylan mit einer Azetylgruppe verknüpft ist und daß der Ligninanteil des Holzes wesentlich geringer ist, als durch die Säurehydrolyse bestimmt wurde[2]).

Der Aufbau einer Membran (der des Steinnußsamens) aus chemisch verschiedenen Stoffen wurde makrochemisch von Lüdtke[3]) bewiesen. Durch Behandlung mit Chlordioxyd und nachfolgend mit Natriumsulfit (E. Schmidt u. Graumann, Ber. deutsch. chem. Ges., 1921, LIV, S. 1864; E. Schmidt u. Malyoth, ebenda, 1924, LVII, S. 1835) wurde die Substanz der Mittellamelle entfernt, die vielleicht den Pektinen nahesteht. Der Rest ließ sich in Mannan A, Mannan B und Zellulose aufspalten. Die Eigenschaften der so erhaltenen Membranstoffe gehen aus umstehender Tabelle hervor.

Die Gerüstsubstanz von Kohlblättern liefert durch Hydrolyse Xylose, Fruktose und Glykose.

---

[1]) E. Schmidt, W. Haag u. L. Sperling, Zur Kenntnis pflanzlicher Inkrusten (VI), Ber. deutsch. chem. Ges., 1925, LVIII, S. 1394.

[2]) E. Schmidt, Y. C. Tang, W. Jandebeur, Die Darstellung von Skelettsubstanzen aus inkrustierten pflanzlichen Zellwänden mittels Chlordioxyds nach dem Einstufen-Verfahren, die Naturwissenschaften 1930, XVIII, S. 734.

[3]) M. Lüdtke, Zur Kenntnis der pflanzlichen Zellmembran, Über die Kohlenhydrate des Steinnußsamens, Liebigs Annalen 192, CCCCLVI, S. 205.

H. Pringsheim und H. Borchard, Über die Gerüstsubstanz der Kohlarten, Ber. deutsch. chem. Ges. 1930, LXIII. S. 664.

	Mannan A	Mannan B	Cellulose
$[\alpha_D{}^{20}]$ in n-NaOH.	—44,94°	unlöslich	unlöslich
α^{20} n Kupferlösung 4 mg Aequ. $Ca_6H_{10}O_5$ 10 mg Mole Cu $(OH)_2$, 1350 mg Mole NH_3)	+ 0,88°	darin nur wenig löslich	—3,44°
α^{18} nach weiterer Zugabe von 10 mg Molen NH_4HCO_3 + 5 mg Cu $(OH)_2$	+ 0,61°	+ 0,52°	—2,05°
$\alpha_D{}^{20}$-Azetat in Chloroform	—29,41°	—25,2°	—19,3°
Verhalten gegen Chlorzinkjod . . .	—	+	+
Verhalten gegen Jod-Schwefelsäure .	—	—	+

In der „Kutinlage" der Epidermis von Clivia sind, wie Anderson[1]) festgestellt hat, Kutin, Zellulose und Pektin vorhanden.

Rosenthaler[2]) unterscheidet saure und neutrale Membranen. je nachdem nach Einlegen in Ferrichlorid und Auswaschen mit Wasser bereits mit Ferrocyankalium allein eine Blaufärbung eintritt oder erst nach Zusatz einer verdünnten Mineralsäure. Letztere Erscheinung zeigen die neutralen Membranen, z. B. Zellulose, erstere die sauren (oder deren Salze), wie sie im Kollenchym und Siebröhren vorliegen.

Als ein allgemeines Reagens zum Nachweis pflanzlicher Gewebe, die Pentosane enthalten, betrachten Fourment und Roques[3]) ihr Benzidinreagens (1 g Benzidin durch Kochen in 10 ccm Eisessig und 30 ccm Wasser gelöst, Wasser zu 50 ccm). Verholzte Membranen ebenso kutikularisierte, verkorkte und pektinisierte, Gummi- und Pflanzenschleime werden gelb bis orange (Einwirkungsdauer 5 Minuten und länger). Die Färbungen sind löslich in Weingeist, unlöslich in Wasser und Glyzerin. Kontrastfärbung von Zellulosemembranen mit Methylenblau 1 : 1000, Benzoazurin (gesättigte Lösung), Hämatoxylin usw.).

Ein gutes Mittel, um die Beschaffenheit der Zellwände zu erkennen, liegt nach Schwarz in der Anwendung substantiver Farbstoffe (s. S. 78).

---

[1]) Anderson, Donald B., Struktur und Chemismus der Epidermisaußenwand von Clivia nobilis, Jahrb. wiss. Bot. 1928, LXIV, S. 501.

[2]) L. Rosenthaler, Über das Verhalten von Zellmembranen gegen Eisensalze, Ber. deutsch. pharmazeut. Gesellsch. 1921, XXXI, S. 27.

[3]) P. Fourment und H. Roques, Das Diphenylendiaminazetat (Benzidinazetat) zum mikrochemischen Nachweis und zur Färbung pflanzlicher Gewebe, die Pentosane enthalten. Bull. soc. pharm. Bordeaux 1926, LXIV, S. 22.

Die Eigenschaften der Haupt-Membranstoffe gehen aus folgender von Anderson[1]) herrührender Übersicht hervor:

I. Verhalten im polarisierten Licht

1. Zellulose ist optisch positiv.

2. Kutinisierte Zellulose ist optisch negativ. Beim Erhitzen wird die kutinisierte Zellulose isotrop, erhält aber beim Erkalten auf Zimmertemperatur ihr optisch negatives Verhalten wieder zurück (Ambronn 1888).

3. Pektinstoffe sind isotrop.

4. Reines Kutin ist zuweilen isotrop.

II. Lösungsreaktionen

1. Zellulose:
   a) Lösung in Kupferoxydammoniak;
   b) Hydrolyse durch 90proz. Schwefelsäure;
   c) Unlöslichkeit in warmen verdünnten Mineralsäuren.

2. *Pektinstoffe:*
   a) Unlöslichkeit in Kupferoxydammoniak;
   b) Löslichkeit in verdünntem (3—5proz.) Wasserstoffperoxyd nach mehreren Stunden bei einer Temperatur von 50°;
   c) Löslichkeit in heißer 5proz. Salzsäure und nachfolgendem heißem 5proz. Ammoniak.

3. Kutin:
   a) Unlöslichkeit in Kupferoxydammoniak;
   b) unlöslich in verdünnten heißen Mineralsäuren;
   c) unlöslich in konzentrierten Mineralsäuren;
   d) Entfernung durch zweistündiges Kochen mit verdünnter weingeistiger Kalilauge;
   e) Entfernung durch kurzes Erhitzen mit konzentrierter Kalilauge.

4. Hemizellulosen:
   a) Hydrolyse durch zweistündiges Kochen mit 10proz. Salzsäure;
   b) Löslichkeit in Kupferoxydammoniak;
   c) nicht merklich angegriffen durch zweistündige Behandlung mit warmem verdünntem Wasserstoffperoxyd.

III. Färbungsreaktionen

1. Zellulose:
   a) Violettfärbung mit Chlorzinkjod (vgl. dazu S. 906);
   b) Blaufärbung und Quellung mit Jodjodkalium und Schwefelsäure;
   c) keine oder nur gelinge Färbung mit verdünnten Lösungen von Rutheniumrot und Methylenblau.

---

[1]) Anderson, Donald, B., Struktur und Chemismus der Epidermis-Außenwand von *Clivia nobilis*, Jahrb. wiss. Bot., 1928, LXIV, S. 501.

2. Pektinstoffe:
   a) Intensive Rotfärbung mit Rutheniumrot;
   b) intensive Blaufärbung mit Methylenblau.
3. Kutin:
   a) dunkle orangerote Färbung mit Sudan III;
   b) kräftige Rotfärbung mit Scharlach R.

Manche Bestandteile der Membran haben die Eigenschaft, alkalische Kupferlösung zu reduzieren.

Zellulose

Zellulose steht unter den membranaufbauenden Stoffen an erster Stelle. Sie ist oft, auch in den sog. Zellulosemembranen, mit wechselnden Mengen von Hemizellulosen u. a. vereint. Die chemische Erforschung begann mit Payen, der den Membranstoff benannte. *Wir bezeichnen jetzt mit Zellulose* jene Membranstoffe, die sich mit verdünnten Säuren (2 %) nicht hydrolysieren lassen und bei Behandlung mit konzentrierten Säuren nur Traubenzucker liefern (Dextrozellulose, E. Schulze 1889). Durch Oxydationsmittel gibt sie Oxyzellulose.

Staudinger[1]) zählt Zellulose (wie Stärke) zu den koordinativen Molekülkolloiden. Franz[2]) tritt für die Formel $(C_6H_{10}O_5)n\text{-}H_2O$ ein.

Kristallisierte Zellulose haben Hess u. Schultze[3]) aus der Ramiefaser isoliert, indem sie die durch teilweise Azetylierung der Ramiefaser erhaltenen Präparate mit Chloroform oder Eisessig behandelten. Die unangegriffenen Anteile bildeten scharf umgrenzte, im Polarisationsmikroskop völlig auslöschende spindelförmige Kristalle, die parallel zueinander in der Längsrichtung der Faserachse liegen. Über Gilsons kristallisierte Zellulose s. S. 902.

Ketten von 50—80 Glykoseresten sind nach K. H. Meyer[4]) in der festen Zellulose zu einem Kristallit (Mizell) zusammengefügt; in den ganzen Kristalliten sind 40—60 solcher Ketten zusammengebündelt.

Staudinger und Schweitzer nehmen an, daß in den Makro-molekülen der Zellulose 500—1000 Glykose-Reste gebunden sind (Ber. deutsch. chem. Ge., 1930, LXII, S. 2319).

Nach einer von K. H. Meyer, H. Hopff und H. Mark entwickelten Anschauung besteht die Hauptvalenzkette der Zellulose aus Zellobioseresten, die nach einer diagonalen Schraubenachse angeordnet sind.

Ambronn und seine Schüler hatten in Verfolgung der Naegelischen Ideen (s. a. S. 885) die Gesamtdoppelbrechung natürlicher Zellulosefasern in Stäbchen- und Eigendoppelbrechung zerlegt und dadurch die Auffassung gewonnen, daß

---

[1]) H. Staudinger, Über die organischen Kolloide, Ber. deutsch. chem. Ges., 1929, LXII, S. 2893.

[2]) A. Franz, Über Zellulose, Zeitschr. angew. Chem., 1930, XLIII, S. 176.

[3]) K. Hess u. G. Schultze, Über die präparative Abscheidung von Zellulosekristallen aus Bastfasern, Annal. Chem., 1927, CCCCLVI, S. 55.

[4]) K. H. Meyer, Chemie der Mizelle, Biochem. Zeitschr., 1929, CCVIII, S. 1.

sie aus in regelmäßiger Weise angeordneten anisotropen den Charakter von Kristallen besitzenden Längsteilchen bestehen. Das Vorhandensein von Kristallen, die parallel zur Faserachse orientiert sind, ergab sich ferner aus den Röntgenuntersuchungen, die von Scherrer, Herzog, Jancke und Polanyi mit Ramiefasern vorgenommen wurden.

Durch eine monokline, quadratische Form mit den Achsen a = 8,3, b = 7,9 c = 10,3 Å, $\beta = 84^0$ lassen sich alle derzeit bekannten und genau vermeßbaren Interferenzen der Zellulose ihrer Lage nach deuten (Mark und K. H. Meyer).

Hesse und Schultze rechnen noch mit der Möglichkeit, daß die von ihnen beobachteten Kristallspindeln in eine vielleicht amorphe oder klein kristallisierte Zellulose eingebettet sind.

Auf Mizellarstruktur der Zellulose weisen auch die Beobachtungen hin, die H. Müller[1]) bei dem Quellen von Pflanzenfasern in Kupferoxydammoniak machte.

Gegenüber allen durch röntgenographische Verfahren gewonnenen Ergebnissen hält Staudinger (z. B. Ber. deutsch. chem. Ges., 1930, LXIII, S. 3132) daran fest, daß das Molekül der Zellulose sehr groß ist.

Zellulosemembranen erscheinen bei mikroskopischer Betrachtung hell und schwach lichtbrechend, im polarisierten Lichte doppelbrechend. Reine Zellulose ist optisch positiv. Gaidukov (Lit. S. 711) hat Ramiefasern, leere Zellen von Oedogonium u. a. näher ultramikroskopisch untersucht.

Auf Grund von Röntgenuntersuchungen hat Sponsler[2]) folgendes Bild vom Bau der Ramiefaser entwickelt.

Die chemischen Einheiten, wahrscheinlich $C_6H_{10}O_5$, sind in Ketten angeordnet, die längs der (Ramie-)Faser in sehr gleichmäßigen Abständen parallel zueinander verlaufen. Sie sind in Schichten angeordnet, zwischen denen sich gleichmäßige Zwischenräume befinden. Einige Schichten verlaufen in Längsrichtung der Faser, andere kreuzen sie unter verschiedenen Winkeln.

Zu diesem Bild geben Sponsler und Dore[3]) noch weitere Einzelheiten. Die die Ramiezellulose bildenden Einheiten sind Glykoseeinheiten mit Amylenoxydring, die in unendlicher Länge in Ketten parallel der Faserlänge angeordnet sind. Die Verbindung zwischen den Einheiten ist abwechselnd eine 1—1- und 4—4-Brücke. Die einzelnen Ketten liegen in Rechtecken von der Größenordnung 6,10 × 5,40 Å. Die Einzelglieder in jeder Kette wiederholen sich alle 10,25 Å. Die größte Breite der Glykoseeinheit liegt längs der Diagonalen des

---

[1]) H. Müller, Die Quellung von Pflanzenfasern in Kupferoxydammoniak, Faserforschung, 1929, VII, S. 205.

[2]) O. L. Sponsler, The molecular structure of the cell wall of fibers. A summary of X-ray investigations, Amer. Journ., Bot., 1928, XV, S. 525, nach Bot. Zentralbl., 1929, N. F. XV, S. 66.

[3]) O. L. Sponsler und W. H. Dore, Die Struktur der Ramiezellulose, abgeleitet aus den Untersuchungen mit Röntgenstrahlen, Cellulosechemie, 1930, XI, S. 186, nach Chem. Centralbl., 1930, II, S. 3265.

Rechtecks 6,10 × 5,40. Mindestens acht Glykoseeinheiten in beschriebener Weise vereint können die Zellulosestruktur repräsentieren. Auch andere Zellulose besitzt wahrscheinlich dieselbe Struktur.

Zuweilen erfolgt Bildung von Zellulose innerhalb der Zelle. Hierher zählen: die Bildungen in der Samenschale von Cuphea, die Zellulosebalken in Caulerpa und in den Embryosäcken, die Umhüllung verschiedener Oxalate und die Klumpenbildung in den von der endotrophen Mykorrhiza befallenen Zellen von Neottia nidus avis, Psilotum u. a. In den letztgenannten Fällen wird der Zellulosebalken von einer Schicht abgestorbener Hyphen lose umhüllt.

Beim mikrochemischen Nachweis der Zellulosemembranen stehen an erster Stelle die Reaktionen mit Kupferoxydammoniak und mit Jodschwefelsäure. Lösungsreaktionen werden mit Kupferoxydammoniak, Schwefelsäure und mit Chromsäure ausgeführt.

Die Reaktion mit Kupferoxydammoniak wurde von Schweizer[1]) 1857 aufgefunden; er stellte sein Reagens in der Weise her, daß er aus einer Kupfersulfatlösung mit verdünnter wässeriger Natronlauge Kupferhydroxyd ausfällte, dieses mit Wasser gut auswusch und dann in konzentriertem Ammoniak auflöste.

Die reinsten Lösungen erhält man nach Dischendorfer[2]), wenn man gut gewaschenes kristallisiertes Böttgersches Kupferhydroxyd[3]) in möglichst wenig starkem Ammoniak löst. Man läßt in sorgfältig verschlossener Flasche unter öfterem Schütteln 1—2 Tage stehen und zentrifugiert von einem Überschuß an Kupferhydroxyd ab. Kupfergehalt 20—25 g im Liter. Weniger reine Lösungen erhält man, wenn man amorphes blaues Kupferhydroxyd sofort in Ammoniak löst. Durch einstündiges Schütteln von feinem Kupfergewebe (feinen Blechschnitzeln oder Litzendraht) mit starkem Ammoniak und der vierzigfachen Menge Luft bei einer 5⁰ nicht übersteigenden Temperatur erhält man Lösungen, die 40—50 g Kupfer im Liter enthalten. Stellt man die Lösung bei Zimmertemperatur her, so enthält sie 20—25 g Kupfer, ebenso wenn man die bei 5⁰ hergestellte Lösung Zimmertemperatur annehmen läßt. Zur Darstellung füllt man eine Flasche zu einem Drittel ihres Volumens mit Ammoniak, bringt das Kupfer dazu und schüttelt höchstens eine Stunde im Schüttelapparat, indem man nach je drei Minuten langem Schütteln für einige Sekunden den Stöpsel lüftet. Von dem überschüssigen Kupfer gießt man ab.

Die Lösungen bewahrt man in kleinen vollkommen gefüllten mit Kautschukstopfen verschlossenen Fläschchen. Oder man verwendet kleine Spritzfläschchen

---

[1]) E. Schweizer, Journ. prakt. Chem., 1857, LXXII, S. 109.

[2]) O. Dischendorfer, Über das Zellulosereagens Kupferoxydammoniak, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1922, XXXIX, S. 97.

[3]) Zur Darstellung kristallinischen Kupferhydroxyds versetzt man siedende Kupfersulfatlösung tropfenweise mit Ammoniak, bis der anfänglich grüne Niederschlag blau geworden ist. Man wäscht das so entstandene basische Sulfat gründlich mit heißem Wasser und digeriert es mit „mäßig konzentrierter" Natronlauge bei 20—40⁰. Amorphes Kupferhydroxyd erhält man, indem man Kupfersalzlösungen mit Alkali in der Kälte versetzt und gut auswäscht.

mit Gummiball, deren Ausflußrohr mit gutgedichtetem Glashahn versehen ist, während die Lösung mit einer ½ cm hohen Paraffinölschicht überdeckt wird.

Zur Lösung der Zellulose verwendet man Schweizers Reagens unverdünnt oder mit wenig Ammoniak verdünnt bei niederer Temperatur. Durch entsprechend verdünnte Lösungen kann man Quellung statt Lösung erzielen.

Zu seinen Quellungstudien mit Kupferoxydammoniak ging H. Müller (l. c. S. 899, 1) folgendermaßen vor. Die Fasern werden mit alter unwirksamer Lösung getränkt und unter ein auf Füßchen ruhendes Deckglas gebracht. Dann wird die unwirksame Lösung durch wirksame verdrängt. Diese wird gewonnen, indem man 20 g Kupferhydroxyd[1]) oder hellgrünes basisches Kupferkarbonat[2]) in 100 ccm 25proz. Ammoniak löst.

Das Teilchengewicht der Zellulose in Kupferoxyd-Ammoniak wurde von Stamm zu 40000—45000 bestimmt.

Über die Erscheinungen, die sich bei Quellung und Lösung der Zellulose in Kupferoxydammoniak abspielen s. K. Heß und Mitarbeiter, Kolloid-Ztschr. 1930, LI, S. 89; Ztschr. physik. Chem. 1929, Abt. A, CXXXXV, S. 401 und Ztschr. angew. Chem. 1930, XLIII, S. 471.

Nur wenn Membranen vorliegen, die fast ganz aus Zellulose bestehen und die nicht von derben Kutikular- oder Korkschichten geschützt werden, kann man an zarten Präparaten, die aus wenigen Zellen bestehen, die Reaktion (öfteres Durchsaugen) unter Deckglas ausführen. Es ist bei Geweben jedoch vorteilhafter, die Schnitte in einem bedeckten Schälchen zu mazerieren. Derart läßt sich bei dünnen Schnitten aus parenchymatischen Geweben in 2—4 Tagen, aus verholzten Elementen in einer Woche sämtliche Zellulose entfernen. Bei Membranen, die überwiegend aus Zellulose bestehen, zeigen Vergleichspräparate ohne weiteres die Wirkung des Reagens. Sind in einer Membran neben der Zellulose Pektine, Hemizellulosen u. dgl. stark vertreten, oder ist die Membran verholzt, so kann man bei optischer Betrachtung von einer Lösung der Zellulose oft nichts erkennen. Man muß durch weitere Reaktionen die Abwesenheit der (herausgelösten) Zellulose feststellen. Aus den mazerierten Schnitten wird das Kupfersalz durch gutes Auswaschen mit 4—5proz. Essigsäure entfernt. Die für Zellulose charakteristischen Jodreaktionen und Färbungen (s. unten) müssen nun negativ ausfallen. Vergleichspräparate gestatten sofort ein sicheres Urteil.

---

[1]) Zur Herstellung des Kupferhydroxyds fällt man es aus 4proz. Kupfersulfatlösung mit kalter Natronlauge, wäscht und trocknet es und bewahrt es nach Pulverung und Siebung auf.

[2]) Das Kupferkarbonat stellt man aus einer 4proz. Kupfersulfatlösung mit 10proz. Sodalösung her.

Nach Gilson[1]) läßt sich die Zellulose aus ihrer Kupferoxydammoniaklösung durch 20—23proz. Ammoniak kristallinisch ausfällen. Diese Eigenschaft wurde zum mikrochemischen Nachweis (auch zur makrochemischen Gewinnung) **kristallinischer Zellulose** herangezogen. Der mikrochemische Nachweis wird dadurch ermöglicht, daß die Zelluloselösung nicht durch die pektinhaltigen Mittellamellen diosmieren kann. Die Versuche sind langwierig und gelingen nicht immer gleich. Sie wurden von Johnson[2]), Love[3]) und van Wisselingh bestätigt. Man benutzt möglichst stärkefreie oder doch stärkearme Parenchymgewebe krautartiger Stengelteile oder Wurzeln. Von den Zellinhalten werden die Präparate durch Behandeln mit Eau de Javelle befreit. Vom Eau de Javelle müssen die Schnitte durch gutes Auswaschen befreit werden. Fette sind durch Alkoholäther zu entfernen. Die vorbehandelten Präparate kommen auf 6—12 Stunden in einem hermetisch verschlossenen Gefäße in Kupferoxydammoniak. Die Flüssigkeit wird nach genügender Einwirkung vorsichtig abgegossen und durch 10proz. Ammoniak ersetzt. Das Ammoniak wird wiederholt durch neues (jetzt 20proz.) ersetzt. Schließlich werden die Schnitte, die leicht auseinanderfallen und daher vorsichtig zu behandeln sind, mit Wasser nachgewaschen. Sie sind nun farblos, zeigen im Zellumen kleinkörnige, krümelige oder dendritische Kristallmassen, die sich in Kupferoxydammoniak lösen, unlöslich in verdünnten Alkalien und Säuren sind und sich mit Kongorot rot färben. Mit Chlorzinkjod werden sie blau, besonders nach Vorbehandlung mit verdünnter Salzsäure. Durch verdünnte Säuren werden die Präparate wesentlich aufgehellt, die Kristalle treten weit deutlicher hervor. Johnson bezeichnet sie als Kristallite, da sie auf das polarisierte Licht nicht einwirken. Die Kristallform ist abhängig von der Konzentration des zum Auswaschen benutzten Ammoniaks. Bei Verwendung von 5proz. Ammoniak entstehen überwiegend kleine Sphärokristalle, bei stärkerem Ammoniak (20 %) erhält man die größten Kristallaggregate[4]).

---

[1]) E. Gilson, La cristall. de la cellulose et la composition chimique de la membrane cellulaire végétale, La Cellule, 1893, IX, S. 397.

[2]) D. S. Johnson, The cristallization of cellulose, Bot. Gazette, 1895, XX, S. 16.

[3]) E. G. Love, Note on the staining of cellulose, Journ. New-York Microsc., 1894, X, S. 70.

[4]) Die Auffindung solcher Sphärokristalle schien nicht beweisend für Zellulose, als Correns sie unter ähnlichen Bedingungen aus der Membran von Caulerpa erhielt, die keine Zellulose enthalten sollte. (Ber. deutsch. bot. Ges., 1894, XII, S. 355; vgl. auch O. Bütschli, Verhandl. d. anturw. med. Vereins Heidelberg, 1894, n. F. V und weiter über die Membran der Siphoneen im Abschnitt „Bemerkungen über die Membran der Kryptogamen".)

Zellulose löst sich unter Hydrolyse in konzentrierter Schwefelsäure, selbst 72proz. Schwefelsäure löst; beim Kochen der verdünnten Lösung entsteht reichlich Glykose. Diese Reaktion ist weniger charakteristisch, da sich gleichzeitig Hemizellulosen, Pektine und oft verholzte Membranen in Schwefelsäure lösen, während in Kupferoxydammoniak sich nur die Zellulose löst. Der Einwirkung der Schwefelsäure wird in zweifelhaften Fällen eine Mazeration oder ein Aufkochen mit Wasser voranzugehen haben. Sind in abgestorbenen oder getrockneten Geweben von den Membranen Gerbstoffe oder Phlobaphene in großer Menge gespeichert worden, so kann die Membran resistent gegen Schwefelsäure sein. Ähnliches gilt von Alkoholmaterial. So berichtet Lidforss (Lit. S. 296, 1), daß bei Primula farinosa (Blütenstandsachse) die Wände gewisser Idioblasten sich in Schwefelsäure und Chromsäure (bei Alkoholmaterial) wie Kork verhielten, während sie sich bei lebendem Material in diesen Reagentien auflösten, und Debski (Lit. S. 233, 3) erwähnt Zellwände bei Blättern der Marantaceen, die sich in frischem Zustande leicht in Schwefelsäure lösen, durch Alkohol aber gebräunt und unlöslich in Schwefelsäure werden. Man verwende möglichst kleine, nur wenige Zellen große Präparate und setze die Säure dem trocken unter Deckglas oder doch nur in wenig Wasser liegenden Schnitte zu. Auch ist darauf zu achten, daß die Schwefelsäure wirklich konzentriert ist (s. S. 17). Verschiedene (irrtümliche) Literaturangaben über Unlöslichkeit in Schwefelsäure beruhen auf Benutzung schlecht aufbewahrter Säure. Im allgemeinen sind nach Russow (Lit. S. 712, 4) Zellulosemembranen der Wasserpflanzen resistenter gegen Säure als die von Landpflanzen; Angaben aus neuerer Zeit fehlen hierüber.

Chromsäurelösung, die je nach ihrer Konzentration Zellulose schnell auflöst, wird nur nebenbei zur Charakteristik herangezogen, da sie verholzte Membranen u. a. ebenfalls löst.

Chlorzink-Essigsäureanhydrid (Chlorzink in der zweifachen Gewichtsmenge Essigsäureanhydrid gelöst) soll nach Cross und Bevan[1]) ebenfalls Zellulose lösen. Czapek (Biochemie I, S. 526) und Tschirch (Handbuch II, S. 242) geben (irrtümlicherweise) an, daß sich Zellulose in Chlorzinksalzsäure (1 + 2) lösen soll. Nachprüfungen an Baumwolle und an Geweben ergaben, daß Chlorzink weder mit Essigsäureanhydrid noch mit Salzsäure mikrochemisch Vorteile bietet. Hanausek[2]) hat eine Lösung mit Salzsäure-Essigsäureanhydrid nicht erzielen können, hält das Reagens aber für geeignet, um die feineren Strukturverhältnisse der Membran hervortreten zu lassen.

Die während der Lösung auftretenden Bilder sind recht charakte-

---

[1]) Cross und Bevan, Chem. News, LXIII, S. 66.

[2]) T. F. Hanausek, Kleine Mitteilungen IV, Lösungsmittel der Zellulose, Chem. Ztg., 1894, XVIII, S. 441.

ristisch; selbst die feinsten plasmatischen Reste (Plasmabeläge der Bastfasern und Gefäße) werden sichtbar (Fig. 176). Zum Studium der Lösungsvorgänge diente auch Schwefelsäure in Verbindung mit Jod oder mit Kaliumdichromat. Die Chromatschwefelsäure (S. 153 u. 752) hat Hanausek[1]) zur Unterscheidung der Lein- und Hanffaser benutzt. Bei Linum tritt der Plasmaschlauch wellenförmig und unregelmäßig gewunden hervor, bei Cannabis erscheint er mit geradem Verlauf. Die sekundären Verdickungsschichten von Cannabis bleiben weit länger erhalten als die von Linum. Nur der Hanffaser ist an der Außenseite eine bräunliche sekretartige Masse aufgelagert, die sehr resistent ist. Bekannt sind die Lösungserscheinungen in Kupferoxydammoniak, welche die mit kutinisierten und verholzten Außenmembranen versehenen Trichome und Fasern zeigen. Das Reagens kann auf die inneren zellulosehaltigen Schichten nur an den verletzten Stellen der Kutikula und der primären Membran einwirken; an diesen Stellen tritt die Zellulose bei der Lösung blasenförmig heraus und preßt die nicht angreifbaren äußeren Schichten beiseite. Gleichzeitig wird der Plasmaschlauch gut sichtbar (Fig. 177).

Fig. 176. Bastfaser, vor und während der Einwirkung von konz. Schwefelsäure; Plasmaschlauch und Tüpfelfüllungen treten hervor (Tunmann)

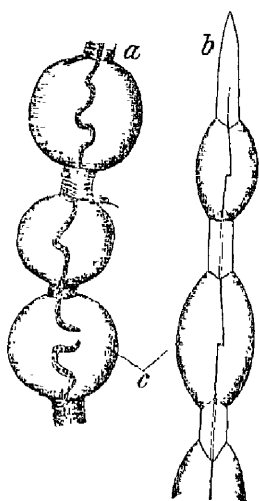



Fig. 177. Einwirkung von Kupferoxydammoniak auf Gossypium (a) und Cinnamomum camphora (b); blasenartiges Hervorquellen der Zellulose bei c (Tunmann)

Von verdünnten und konzentrierten Alkalien, verdünnter und konzentrierter Salpetersäure, von Schultzeschem Gemisch wird Zellulose nicht gelöst, doch erfolgt Quellung, wodurch feinere Strukturverhältnisse besser sichtbar werden. Verdünnte und 25proz. Salzsäure löst (selbst beim Aufkochen) nicht; dadurch unterscheidet sich die Zellulose von den Hemizellulosen (s. d.); aber mit 41proz. Salzsäure geht Zellulose in Lösung (Willstätter und Zechmeister).

Reine Zellulose färbt sich mit Jodjodkalium oder mit weingeistiger Jodlösung gelblich bis schwach braun. Durch mäßig verdünnte Schwefelsäure (70—95%) wird Zellulose unter Gallertbildung in Hydrozellulose übergeführt

---

[1]) T. F. Hanausek, Eine neue Methode zur Unterscheidung der Flachs- und Hanffaser, Zeitschr. f. Farbenind., 1908, Heft 7, Sep.

und diese wird von Jodreagentien gebläut. Hierauf beruht der beste mikrochemische Nachweis der Zellulose mit **Jod-Schwefelsäure**, der 1838 von Schleiden angegeben wurde, nachdem Gmelin[1]) vorher (1830) die gleiche Reaktion mit Papier ausgeführt hatte. Man benutzt eine jodarme Jodjodkaliumlösung (0,3 J, 1,5 KJ, 100,0 Wasser) und eine mäßig verdünnte Schwefelsäure (3 + 1 Wasser). Bei Verwendung konzentrierterer Lösungen treten störende Jodausscheidungen auf und die Präparate lösen sich schnell in der Säure. Die Schnitte werden mit der Jodlösung gut durchtränkt, bleiben einige Zeit liegen, dann wird ein kleiner Tropfen Wasser und schließlich die Säure zugefügt. Unter Quellung und Gallertbildung nehmen alle Zellulosemembranen eine starke Blaufärbung an. Schließlich, besonders bei Gegenwart von viel konzentrierter Säure, findet völlige Lösung und Entfärbung statt. Bei der Reaktion mit Jodschwefelsäure sowie bei den im folgenden angeführten Jodreaktionen darf nun nicht vergessen werden, daß sich außer Zellulose auch verschiedene Hemizellulosen (nicht sämtliche) ebenfalls blau färben. Bei diesen tritt meist die Blaufärbung mit Jod bereits bei Gegenwart einer sehr stark verdünnten Säure ein (zuweilen genügt die Anwesenheit von viel Jodwasserstoffsäure). Reine Zellulose beansprucht zur Jod-Schwefelsäurereaktion eine mindestens 50proz. Säure (1 + 1 Wasser), gebraucht wird meist eine 75proz.; noch besser ist eine 66½proz.

Um den Nachteil der Jod-Schwefelsäurereaktion, das Auflösen der Präparate, zu beheben, sind weitere Reaktionen eingeführt worden, die ebenfalls die Zellulose mehr oder weniger vollständig in Hydrozellulose überführen und letztere durch Jod färben. Man benutzt Phosphorsäure und Chlormetalle mit Jodzusatz, so daß Überführung in Hydrozellulose und Färbung gleichzeitig ausgeführt wird. Von diesen Reaktionen hat sich in erster Linie die mit **Chlorzinkjod** eingebürgert, welche Schultze[2]) zuerst auffand. Die Präparate werden direkt in das Reagens eingetragen. Zellulosemembranen färben sich, oft erst nach längerer Zeit, mehr oder weniger violett. Die Wirkung des Reagens wird wesentlich modifiziert von dem Alter der Lösung und von dem Gehalt an Chlorzink.

Chlorzinkjod ist, in brauner Glasstöpselflasche aufbewahrt, mehrere Jahre brauchbar. 20,0 g Chlorzink, 6,5 g KJ, 1,3 g J, 10,5 g Wasser. Ein nach dieser Vorschrift (W. Behrens, Tabellen) bereitetes Reagens enthält etwa 52% Chlorzink. Besser wirkt folgende Lösung: 25,0 g Chlorzink, 8,0 g KJ, 1,5 g J, 8,0 g

---

[1]) J. M. Schleiden, Pogg. Ann., 1838, XLIII, S. 391 und Gmelin, Schweigg. Journ., 1830, LVIII, S. 374.

[2]) Nach L. Radlkofer, Liebig Ann., 1855, XCIV, S. 332.

Wasser; sie enthält ungefähr 60% Chlorzink. Man kann schließlich zwei getrennte Lösungen vorrätig halten[1]). Die Schnitte kommen auf wenige Sekunden in Lösung I (Jodjodkalium, 1 + 1 + 100) und werden in einen großen Tropfen Lösung II (Zinkchlorid 2, Wasser 1) übertragen. Bei zu schwacher Färbung muß nochmals Jodjodkalium zugesetzt werden.

Die früher allgemeine Ansicht, daß Blaufärbung mit Chlorzinkjod die Gegenwart von Zellulose beweise, besteht nicht zu Recht.

In den Blättern des Weißkohls, des Blumenkohls und den Strünken des Rotkohls findet sich eine mit Chlorzinkjod Blaufärbung gebende Gerüstsubstanz, die nicht Zellulose ist[2]).

Auch mit einem Mannan des Samens von Phytelephas macrocarpa tritt die Chlorzinkjod-Reaktion ein (Lüdtke)[3]), ferner mit dem Xylan des Bambushalmes (Lüdtke)[4]).

Den Versuch Schulzes[5]), die mit Chlorzinkjod bei Zellulose u. a. eintretende Violettfärbung einer besonderen Molekülgruppe der „Joningruppe" zuzuschreiben, wird kein chemisch Geschulter billigen.

Negativer Ausfall der Zellulosereaktion mit Chlorzinkjod oder Jodschwefelsäure in verholzten Membranen ist auf den lamellaren Aufbau der Membranen zurückzuführen. Zerstört man diesen durch Zermahlen, so tritt die Reaktion auf, da dann die Zellulose nicht mehr durch Lamellen anderer Zusammensetzung geschützt wird[6]).

Aus den aus abwechselnden Lagen von Zellulose und Pektin bestehenden Kollenchymwänden kann man das Pektin herauslösen, indem man die Schnitte mit Wasserstoffperoxyd eine Stunde bei 50° behandelt (Anderson)[7]).

Die schwarzviolette, auffallend positiv dichroitische (Ambronn, 1888) Zellulosefärbung der Chlorzinkjodreaktion ist als gerichtete Adsorption zu deuten,

---

[1]) J. Nowopokrowsky, Über die Chlorzinkjodreaktion der Zellulose, Bull. Jard. imp. bot., St. Pétersbourg 1911, XI, S. 109.

[2]) H. Pringsheim und C. R. Fordyce, Über die Gerüstsubstanz der Kohlarten. Ber. deutsch. chem. Ges., 1929, LXII, S. 831.

[3]) M. Lüdtke, Zur Kenntnis der pflanzlichen Zellmembran. Über die Kohlenhydrate des Steinnußsamens, Ann. d. Chem., 1927, CCCCLVI, S. 201.

[4]) M. Lüdtke, Über die Kohlenhydrate und ihre Verteilung in der Zellwand des Bambusrohres, Ann. d. Chem., 1928, CCCCLXVI, S. 27.

[5]) P. Schulze, Über Beziehungen zwischen pflanzlichen und tierischen Skelettsubstanzen und über Chitinreaktionen, Biolog. Zentralbl., 1921, XLII, S. 388.

[6]) M. Lüdtke, Zur Kenntnis der pflanzlichen Zellmembran II, Ber. deutsch. chem. Ges., 1928, LXI, S. 465.

[7]) D. B. Anderson, Über die Struktur der Kollenchymzellenwand auf Grund mikrochemischer Untersuchungen, Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss. Math. naturw. Kl., Abt. I, 1927, CXXXVI, S. 429. — J. Kisser, Mazeration parenchymatischer Gewebe bei vollständiger Erhaltung des Zellinhaltes, Planta 1926, II, S. 325.

die gelbe Jodreaktion des Lignins, Kutins oder Suberins kommt durch chemische Verbindung oder feste Lösung zustande.

Der Joddichroismus kann zur Erschließung des submikroskopischen Feinbaues der Zellmembranen verwendet werden; die Richtung des Absorptionsmaximums über dem Polarisator gibt die Orientierungsrichtung der Mizellen an.

In kleineren Mengen eingelagertes Lignin oder Kutin kann neben der Zellulose der Zellwände in der Stellung des Absorptionsminimums der dichroitischen Zellulosefärbung nachgewiesen werden.

Die gelben Reaktionen von Lignin, Suberin und Kutin sind im Gegensatz zur Zellulosereaktion nicht dichroitisch. Färbt man Gegenstände wie Jutefasern oder die langen Haare von Erodium gruinum mit Chlorzinkjod und bringt sie über dem Polarisator in die Stellung „farblos", so erscheinen sie je nach dem Ligningehalt schwächer oder stärker gelb gefärbt.

Mit Hilfe des Dichroismus der Zellulosereaktion können in der Stellung des Absorptionsminimums selbst die sonst schwer nachweisbaren ersten Anfänge der chemischen Zellwandveränderungen leicht enthüllt werden[1]).

Die Untersuchung erfolgt in linear polarisiertem Licht über einem Nicol, den man unter den Kondensator in den Beleuchtungsapparat einhängt.

Chlorzinkjodlösung: 1,3 g Jod, 6,5 g Kaliumjodid, 20 g Zinkchlorid, 10,5 g Wasser. In braunen Glasstöpselgläsern aufzubewahren; vor dem Gebrauch filtrieren.

In den Zellwänden der Meristeme, der Wurzel, radicula, plumula und etiolierter Stämme findet sich nach Tupper-Carey und Priestley[2]) ein mit der Zellulose verbundenes, mit den gewöhnlichen Fettlösungsmitteln nicht entfernbares Fett. Erst nach weiterer Behandlung durch Kochen mit weingeistiger Kalilauge tritt die Reaktion mit Chlorzinkjod ein. Die beiden Autoren geben folgende Übersicht über das Verhalten der Wände von Meristemen gegen Zellulosereagentien:

1. Bei der radicula, der Wurzel und der plumula tritt die Reaktion mit Jod und Schwefelsäure erst nach Vorbehandlung mit starken Säuren oder Alkalien, die Chlorzinkreaktion erst nach Vorbehandlung mit wässeriger oder weingeistiger Lauge ein. 2. Bei etiolierten Stämmen tritt die Jod-Schwefelsäurereaktion direkt, die Chlorzinkjodreaktion erst nach Kochen mit wässeriger oder weingeistiger Lauge ein. 3. Normale grüne Stämme geben die Jod-Schwefelsäurereaktion direkt, die Chlorzinkjodreaktion nach kurzer Vorbehandlung mit verschiedenen Reagentien.

Wahrscheinlich ist es die Gegenwart von Eiweiß, die das Eintreten der Jod-Schwefelsäurereaktion verhindert.

Das Meristem der radicula, plumula und Wurzel von Vicia Faba gibt die Zellulosereaktion mit Jod und reiner 70proz. Schwefelsäure erst nach einer der

---

[1]) A. Frey, Das Wesen der Chlorzinkjodreaktion und das Problem des Faserdichroismus. Jahrb. f. wiss. Bot., 1928, LXVII, S. 597.

[2]) R. M. Tupper-Carey and J. H. Priestley, The composition of the cell-wall at the apical meristem of stem and root, Proceed. Roy. Soc., London B. 1923, XCV, S. 109.

folgenden Behandlungsweisen: 1. 48stündige Behandlung mit Ammoniak (spez. Gew. 0,88), 24stündige mit Javellescher Lauge; 2. dreitägige Behandlung mit Javellescher Lauge; 3. Kochen mit 10proz. wässeriger Kali- oder Natronlauge während einiger Minuten; 4. Kochen in 10proz. Schwefelsäure während einiger Minuten; 5. 10proz. Salzsäure ebenso.

Die Chlorzinkjodreaktion in denselben Organen bedarf der Vorbehandlung durch langes Kochen mit wässeriger 40proz. Kali- oder Natronlauge oder kurzes Kochen mit *weingeistiger Kalilauge*.

Die Meristeme der grünen Stämme geben die Chlorzinkjodreaktion erst nach einer der folgenden Behandlungsweisen: 1. einstündige Behandlung mit Javellescher Lauge; 2. Kochen mit 25proz. weingeistiger Salzsäure oder 5proz. wässeriger Salzsäure; 3. Kochen mit 2proz. wässeriger Kali- oder Natronlauge oder Einlegen in kalte konzentrierte Lauge oder kalte konzentrierte wässerige Salzsäure.

Ein zweifelhafter Membranstoff ist das Scytonemin, das sich von der Zellulose dadurch unterscheiden soll, daß es sich mit Jodschwefelsäure und Chlorzinkjod erst violett färbt, wenn es zunächst mit verdünnter Salzsäure und dann mit Jod behandelt wurde (F. Panini, Archivio Botanico Modena, 1925, I, S. 34).

Weitere Jodreagentien auf Zellulose hat Mangin[1]) empfohlen. Allgemeiner in Aufnahme ist Jodphosphorsäure gekommen. Die Schnitte gelangen direkt in das Reagens, reine Zellulosemembranen werden kräftig violett gefärbt. Präparate, die zuvor in Wasser gelegen haben, werden durch Betupfen mit Fließpapier abgetrocknet. Man gebraucht eine möglichst konzentrierte Phosphorsäure, die sich aus der Handelsware durch Eindampfen auf dem Wasserbade leicht herstellen läßt. Die Säure muß wenigstens 50% Orthophosphorsäure enthalten; sie hat dann Sirupkonsistenz (20 ccm Säure, 0,5 KJ, 0,2 J, ein Erwärmen zwecks völliger Lösung ist nicht nötig, ein Überschuß an Jod nicht schädlich). Die Säure kann auch während der Reaktion verstärkt werden. Man bringt die Schnitte in Jodphosphorsäure und bedeckt sie mit einem Kristall kristallinischer Phosphorsäure. Der Kristall löst sich langsam auf, die Zellulosewände treten, besonders wenn sie vorher mit verdünnter Eau de Javelle gereinigt wurden, dunkelblau hervor.

Nach Grüss (Studien über Reservezellulose, Bot. Zentralbl., 1897, LXX, S. 242) läßt sich Jodphosphorsäure aus der in Stangenform erhältlichen Phosphorsäure bereiten, die man bis zur Sirupkonsistenz in Wasser löst; die Lösung wird mit einigen Körnchen Jodkalium und Jod versetzt. Das Reagens ist in kurzer Zeit gelbbraun.

---

[1]) L. Mangin, Sur les réactifs jodés de la cellulose, Bull. Soc. bot. de France, 1888, XXXV, S. 421 und Observat. s. l. développement du pollen, Bull. Soc. bot. de France, 1889, XXXVI, S. 274.

Chlorkalzium-Jodlösung gibt gute Erfolge und färbt reine Zellulosewände erst rosenrot, später violett. Das Reagens wird (Zimmermann) hergestellt aus 10 ccm konzentrierter Chlorkalziumlösung, 0,5 g KJ, 0,1 g J. Durch schwaches Erwärmen wird ein Teil Jod gelöst und die Lösung durch Glaswolle vom überschüssigen Jod abfiltriert. Nach angestellten Nachprüfungen schadet aber das überschüssige Jod im Reagens nicht, die Lösung war nach einem Jahre noch wirksam (Lichtabschluß).

Schneller als Chlorzinkjod soll nach Mangin Aluminiumchlorür und Jod wirken, die Färbung soll sich einige Tage halten. Metallisches Aluminium wird in Salzsäure gelöst, die Lösung bis zur Sirupkonsistenz eingedampft und mit 1 % J und 0,5 % KJ versetzt. Färbt dunkelblau bis violett. Eine himmelblaue Färbung soll Jodzinnchlorid geben. Spiritus fumans Libavii (gewonnen durch Überleiten von Chlor über erwärmtes Zinn oder Zinnchlorür) wird durch möglichst wenig Wasser zersetzt, dann mehr Wasser zugefügt, ohne daß es zur Lösung kommt, und schließlich werden einige Tropfen einer Lösung von Jod und Chlorkalium in Wasser zugefügt. Die Reaktion gelingt nicht gut.

Zur Reinigung der Zellulosemembranen benutzt van Wisselingh Glyzerin. Die Schnitte kommen in kleine Glasröhrchen mit Glyzerin, die Röhrchen werden zugeschmolzen und bis auf 300° erhitzt, was innerhalb ½ Stunde ausgeführt werden kann[1]) (Ausführung s. Chitin). Reine Zellulose wird nicht angegriffen, wohl aber werden sehr viele Bestandteile entfernt (nicht gelöst, sondern zersetzt). Hauptsächlich Hemizellulosen (Amyloid) widerstehen aber ebenfalls der Glyzerineinwirkung. Das Reinigungsverfahren, das auch durch Mazeration mit verdünnten Alkalien und Eau de Javelle oder kurzes Kochen mit weingeistiger Kalilauge ausgeführt werden kann, dient besonders zur Erzielung guter Jodfärbungen und zum Nachweis von Zellulose neben anderen Membranstoffen.

„Selbst das gründlichst wirkende Wisselinghsche Glyzerinverfahren vermag einzelne Hemizellulosen nicht zu zerstören. Ein absolut vollkommen wirkendes Reinigungsmittel für Zellulosewände gibt es nicht.“ (Kowallik, Ref. Bot. Zentralbl., CXXXVIII, 1918, S. 142.)

Zur Befreiung der Zellulosemembranen von Pektinstoffen benutzt man 3—5 proz. Wasserstoffperoxyd, das man mehrere Stunden bei 50° einwirken läßt[2]).

---

[1]) Erhitzt man nur auf 125°, dann muß sechs Stunden erhitzt werden.

[2]) J. Kisser, Mazeration parenchymatischer Gewebe bei vollständiger Erhaltung des Zellinhaltes, Planta 1926, II, S. 325.

Anderson, Donald B., Über die Struktur der Kollenchymzellwand usw., Sitzgsber. Wien. Akad. Wiss. Math. naturw. Kl., Abt. B, 1927, CXXXVI, S. 429; derselbe, Struktur und Chemie der Epidermis-Außenwand von Clivia nobilis, Jahrb. wiss. Bot., 1928, LXIV, S. 501.

Färbungen mit Farbstoffen treten ganz allgemein beim Nachweis der Zellulose sehr zurück. Farbstoffe, die lediglich Zellulose färben, gibt es gegenwärtig nicht. Die Intensität der Farbstoffspeicherung hängt keineswegs von dem größeren oder geringeren Gehalt der Membran an Zellulose ab. Hat doch van Wisselingh[1]) gezeigt, daß sich die Haare von Gossypium mit Kongorot nur schwach färben, während nach kurzer Vorbehandlung mit Kupferoxydammoniak und nach gutem Auswaschen eine stärkere Färbung mit Kongorot erzielt wird. Zellulosearme Wände können sich stärker färben als zellulosereiche. Denn bei der Farbstoffaufnahme sind physikalische Faktoren (Dichte der Membran) hervorragend beteiligt. Immerhin lassen sich als Hilfsreaktionen auch Färbungen heranziehen, die besonders für Dauerpräparate geeignet sind. Am meisten benutzt werden Kongorot und Hämatoxylin.

Für Kongorot, welches Klebs[2]) als Reagens auf Zellulose bei Algen und Flagellaten bezeichnete, hat Heinricher[3]) gefunden, daß der Farbstoff auch Hemizellulosen und Schleime färbt. Die Ergebnisse der Färbung sind verschieden, je nachdem eine wässerige, oder eine weingeistige Lösung benutzt wird. Bei Benutzung einer weingeistigen Lösung werden auch verholzte Elemente gefärbt. In der konzentrierten wässerigen Lösung bleiben die Schnitte einen Tag, werden in Weingeist abgespült und in Kanadabalsam eingeschlossen.

Hämatoxylin färbt außer Zellkern und plasmatischen Teilen auch unverholzte und unverkorkte Wände. Reine Zellulosemembranen werden violett gefärbt, verholzte, verkorkte und kutinisierte Wände bleiben ungefärbt oder werden nur gelb bis braun. Die Hämatoxylinfärbung der Zellulose betrachtet Giltay[4]) als spezifisches Zellulosereagens, welches in sehr vielen Fällen der Chlorzinkjodreaktion vorzuziehen sei. Es sei bemerkt, daß der Torus durch Hämatoxylin (S. 751) gefärbt und auch von Phloroglucinsalzsäure gerötet wird.

Zelluloseführende Membranen, die mehr oder weniger große Anteile an Hemizellulosen führen und nicht verholzt sind (Zellulosemembran schlechthin), speichern die verschiedensten Farben. Selbstverständlich können diese Färbungen ebenso wenig als typische Zellulose-

---

[1]) C. van Wisselingh, Mikrochemische Untersuchungen über die Zellwand der Fungi, Jahrb. f. wiss. Bot., 1898, XXXI, S. 619.

[2]) G. Klebs, Organisation der Gallerte bei Algen und Flagellaten, Unt. bot. Inst. Tübingen, 1886, II, S. 369.

[3]) E. Heinricher, Ist das Kongorot als Reagens auf Zellulose brauchbar? Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1888, V, S. 343.

[4]) E. Giltay, Über das Verhalten von Hämatoxylin gegen Pflanzenmembranen, Ak. Wet. Amsterdam, 27. X. 1883, S. 2.

reaktionen angesehen werden, wie die vorher angeführten. Chalon[1]) spricht allerdings Methylenblau als typischen Zellulosefarbstoff an. Porsch benutzt zum Zellulosenachweis essigsaures Anilinblau, Lagerheim Brillantblau. Eine Unzahl Farbstoffe färbt Zellulose, ohne daß eine Beize nötig ist (substantiv). Vorbehandlung mit Säuren oder Alkalien verstärkt die Färbung. Man benutzt daher bei vielen Farben saure (bei Orseillerot, Naphtholschwarz, Azorubin u. a.) oder weingeistige (bei Brillantpurpurin, Benzopurpurin, Benzoazurin u. a.) Bäder. Zuweilen wird in neutralem Bade gefärbt, die gespeicherten Farben werden nachher durch Säuren weiter differenziert.

Als spezielle Zellulosefarbstoffe gelten die Tetrazofarbstoffe Typ Orsellin BB.

Vgl. dazu die Färbung durch substantive Farbstoffe nach Schwarz S. 78.

Doppelfärbungen

Das Färbungsvermögen ist nicht auf Zellulose (und Hemizellulose) beschränkt. Es färben sich alle Membranen, auch die verholzten (s. d.) und die verkorkten (s. d.) mit bestimmten Farbstoffen. Man behandelt daher die Schnitte mit Farbstoffgemischen oder nacheinander mit verschiedenen Farben und erzielt Doppelfärbungen, welche, da sie haltbar sind, sich für Dauerpräparate zu Demonstrationszwecken eignen. Auch bei histologischen Untersuchungen, besonders bei zarten Geweben (Vegetationspunkten, Samenknospen) werden Färbungen benutzt. Doch lassen sich aus den Färbungen allein nur annähernde Schlüsse auf die chemische Zusammensetzung einer Membran ziehen. Überwiegend wird mit Anilinfarben gefärbt, zuweilen wird die Metallspeicherung herangezogen. Die Zeitdauer der Einwirkung der Farbstoffe ist abhängig von den Präparaten, ihrer Vorbehandlung (Fixierung), von der Konzentration der Farblösungen und vielen anderen Faktoren. Teils wird überfärbt (die Präparate gelangen in konzentrierte Lösungen) und dann wird gut ausgewaschen, teils läßt man verdünnte Lösungen längere Zeit einwirken. Zuweilen erfolgt eine Nachbehandlung zur Erzielung weiterer Farbentöne. Die gefärbten Schnitte werden entwässert und in Kanadabalsam eingebettet oder gelangen über Glyzerin in Glyzeringelatine. Aus der Unzahl der vorgeschlagenen Doppelfärbungen seien nur einige Methoden angeführt. Es gibt noch weit mehr brauchbare Methoden (zum Teil sind sie an anderen Stellen dieses Buches angeführt); ein jeder kann sich der-

---

[1]) I. Chalon, Coloration des parois cellulaires, Bull. Soc. roy. Bot. Belg., 1898, XXXVI, S. 12 u. XXXVII, S. 59.

gleichen durch passende Vereinigung von Farbstoffen, die Holz, Kork und Zellulose färben, leicht selbst ausarbeiten.

Chodat benutzt eine schwach ammoniakalische 1proz. Lösung von Kongorot, der 1% Chrysoidin zugefügt ist (Holz strohgelb, Kork goldgelb, Zellulose kirschrot). Eine Doppelfärbung, bei der Holz blau, Zellulose rot wird, läßt sich durch konzentrierte weingeistige Cyaninlösung mit 5% Zusatz einer ammoniakalischen Kongorotlösung erzielen (Roulet)[1]. Mit Hämalaun und Naphthylamingelb färbt Pfeiffer[2]) (Holz gelb, unverholzte Membran violett). Man kann auch die Schnitte nacheinander in die beiden Farblösungen bringen, zuerst auf eine Stunde in Hämatoxylin und dann in eine Lösung von Anilinblau, Methylblau oder Bismarckbraun. Die Schnitte werden mit Weingeist ausgewaschen und in Kanadabalsam eingebettet (Holz rot, Zellulose violett bis blau). Das Lagerheimsche[3]) Farbstoffgemisch besteht aus Sudan III, Brillantblau und Chloranilin. In einer Lsöung von Jodgrün und Grenachers Alauncarmin wird Zellulose rot, Holz und Kork grün. Arcangeli[4]) verwendet zur haltbaren Färbung 4 Teile einer 0,5proz. Methylgrünlösung und 1 Teil einer 5proz. Fuchsinlösung. Chalon (Lit. S. 911, 1) benutzt Preußischblau-Safranin oder Anilinblau-Magentarot. Persico-(Orseillefarbstoff-)Essigsäure in konzentrierter Lösung färbt Zellulose nur sehr schwach[5]), Bast und Sklerenchym stark rotviolett (Chromatophoren und Zellkern braunpurpurn), die Färbung ist haltbar in Glyzerin, gesättigtem Kaliumazetat und in venetianischem Terpentin. Persico-Essigsäure wird ferner empfohlen in Verbindung mit Kernschwarz oder Nigrosin (Kollenchym schwarzviolett), mit Methylgrünessigsäure (Sklerenchym und Kollenchym fleischrot, Glyzerineinbettung), mit Gentianaviolett (Plasma, Zellkern rotbraun, Membran blauviolett, Terpentineinbettung).

J. Kisser[6]) macht Doppelfärbungen, indem er die verholzten Elemente mit Safranin oder Fuchsin-Pikrinsäure und die unverholzten

---

[1]) Ch. Roulet, Nouv. proc. de double-col. d. membr., Arch. d. sc. phys. et nat. Genève, 1893, XXIX, S. 100.

[2]) H. Pfeiffer, Neue Doppelf. für Gewebe mit teilweise verholzten Membranen, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1897, XIV, S. 202.

[3]) G. Lagerheim, Techn. Mitt., Zeitschr. wiss. Mikr., 1897, XIV, S. 350.

[4]) A. Arcangeli, Studi dello Czapek sui tess. lignif., Bull. S. Bot. ital., 1899, S. 167.

[5]) G. Beck von Mannagetta, Über die Verwendung der Persico-Essigsäure zu mikroskopischen Tinktionen, Sitzb. Lotos, 1904, Nr. 7.

[6]) J. Kisser, Über Kernschwarz und seine Anwendungsmöglichkeiten für botanische Zwecke, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1926, XLIII, S. 116.

mit Kernschwarz färbt, das, wie es der Name sagt, auch zum Färben von Zellkernen dient.

Verfahren von Hollendonner[1])

Aufgehellte und ausgewaschene Mikrotomschnitte werden mit weingeistiger Malachitgrünlösung gefärbt und, nach Auswaschen, mit weingeistiger Säurefuchsinlösung. Holz, Kork und Kutikula werden grün, Zellulose rot.

Morquer[2]) kombiniert für eine Doppelfärbung von Zellulose und Lignin Phloroglucin- und Jodreaktion in folgender Weise: Die Schnitte kommen zunächst auf 10 Minuten in eine 2proz. Lösung von Phloroglucin in Weingeist, dann (auf einem Uhrglase) eine Minute in ein Gemisch von 2 Tropfen (= $^1/_{20}$ ccm) einer Lösung von 0,5 g Jod und 1 g Kaliumjodid in 20 g Wasser und 11 Tropfen (= $^1/_5$ ccm) frisch bereiteter rauchender Jodwasserstoffsäure. Die vom Überschuß des Reagens befreiten Schnitte werden in einem Tropfen Glyzerin betrachtet, das unmittelbar vorher mit Jodwasserstoffsäure angesäuert wurde. Die verholzten Elemente sind rot, die aus Zellulose bestehenden violett gefärbt. Die Färbung hält sich einige Minuten.

Das Abmessen soll mit einer Levaditischen Pipette erfolgen.

Stamm[3]) benutzt die ältere Giemsasche Methode.

Man bereitet sich jeweils eine frische Mischung, indem man zu 10 ccm wässeriger 0,05$^0/_{00}$iger Lösung von „Eosin Höchst extra" 1 ccm 0,8$^0/_{00}$ige wässerige Lösung von Azur II gießt. Oder man verwendet eine Verdünnung von 1 Tropfen frischer Grüblerscher Giemsalösung mit 1 ccm kohlensäurefreiem destilliertem Wasser. Darin färben sich dünne Schnitte in 2—3 Minuten; dickere brauchen länger. Man kann auch stärker verdünnte Lösungen längere Zeit einwirken lassen. Nach Beendigung der Färbung spült man das Präparat kurz mit Wasser ab und untersucht in Wasser. Zur Herstellung eines Dauerpräparates läßt man den Schnitt unter dem Deckgläschen austrocknen (am besten über Nacht) und bettet ihn darauf in säurefreien Kanadabalsam ein, indem man, ohne das Deckgläschen zu heben, Kanadabalsam-Xylollösung von der Seite zufließen läßt.

Es färben sich (in Wasser betrachtet) unverholzte Parenchymzellen violett, verholzte blau, Bastfasern und Libriform hellblau, tätige Siebröhren dunkelviolett, obliterierte bläulich violett, Kambium violett bis rötlich violett, Endodermis dunkelblau, Gefäße tiefblau, grünblau, grün, Tracheiden hellblau, Skle-

---

[1]) F. Hollendonner, Ein neues Verfahren zur Doppelfärbung von Zellulose und Holz, Bot. Körlem 1924/25, XXII, S. 36; Ref. Bot. Zentralbl. 1926, N. F. VII, S. 478.

[2]) R. Morquer, Double réactif des lignines et des celluloses, Bull. soc. bot. de France, 1929, LXXVI, S. 516.

[3]) J. Stamm, Mikrochemische Studien mit der „Giemsaschen Lösung für die Romanowsky-Färbung" an verschiedenen Drogen, Pharmacia, 1921, S. 18.

reiden grünblau bis grün, Kork grünblau-graugrün, graublau, bei Überfärbung schwarzblau, schwarzgrün, Schleim (Lini, Cydoniae, Althaeae) violett, Eiweißkörper eosinrot, rosa.

Eine Ausnahme macht die Wurzel von Uragoga Ipecacuanha, von der die Zellwände aller Korkreihen blau bis blauviolett gefärbt sind. Die Inhaltsmasse der jüngsten 2—3 Reihen färbt sich intensiv rot, die der äußeren grün bis blauschwarz.

Zum Färben der jüngsten Zellwände (Vegetationsspitzen) empfehlen van Leeuwen-Reijnvaan[1]) eine Kernschwarz-Methode. Mikrotomschnitte kommen auf 1½ Stunden in Kernschwarz (Grübler) und dann auf 1—2 Tage in Safranin (1 g Safranin, 100 ccm absoluter Alkohol, 200 ccm Wasser) und werden mit salzsäurehaltigem Alkohol differenziert (Kernchromatin schwarz, Nukleolen rot, Plasma rosa, Zellwände hellrot). Die Färbung ist jahrelang haltbar. — Man kann auch mit Hämatoxylin (3—10 Minuten) und dann mit Lichtgrün (4—6 Minuten) färben (0,1 g Lichtgrün, 100 Teile Wasser, 4 Teile Formalin 40proz.) und mit 70proz. Weingeist abspülen. Zum Studium der Samenknospen dient Safraningentianaviolett. Zusatz von Orange G läßt die Pollenschläuche hervortreten[2]).

Die Schließhaut der Hoftüpfel und des Torus läßt sich mit Hämatoxylin färben. Zimmermann (Mikrot.) benutzte Weingeistmaterial. Die Präparate (Versuchsobjekt Coniferenholz) kommen auf 15 Minuten in Hämatoxylin (Böhmer), werden in Wasser abgeschwenkt, dann folgt Alkohol, Nelkenöl, Kanadabalsam. Innerhalb 5 Minuten färbt das Hämatoxylin nur Zellkerne und die Schließhäute. Kowallik[3]) gibt folgendes Verfahren: Die Schnitte (Weingeistmaterial. Pinus) werden auf dem Objektträger 1 Minute in 1proz. wässerigen Anilingrün erhitzt, mit Wasser abgespült und mit Chrysoidin (1 % in 95proz. Weingeist, evtl. mit Wasser verdünnt, 1 + 1) differenziert (1—2 Minuten). Dann folgt, nach kurzem Umschwenken in 95proz. Weingeist, Färbung mit 1 % Fuchsin S (Rubin S in 95proz. Weingeist, 1 Minute), absolutem Alkohol (1 Minute), Xylol (5 Minuten), Kanadabalsam. Tracheiden gelb, Hof grün, Torus glänzend rot.

Die Metallspeicherung wird zur Membran- und Doppelfärbung selten benutzt. Schon Mohl[4]) färbte Schnitte mit Blutlaugensalz und Säure, wollte aber dadurch, im Anschluß an einen Vorschlag von

---

[1]) W. und J. van Leeuven-Reijnvaan, Färben der jungen Zellwände in Vegetationsp., Ber. d. bot. Ges., 1907, XXV, S. 470.

[2]) Shattuck, Morph. stud. of Ulmus, Bot. Gaz., XL, S. 209.

[3]) G. Kowallik, Dauerfärbung der Hoftüpfel, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1911, XXVIII, S. 26.

[4]) H. v. Mohl, Bot. Ztg., 1843, I, S. 114.

Boucherie, Nutzholz widerstandsfähiger machen. Strasburger[1]) färbte mit Berlinerblau-Oxalsäure (1,0 Berlinerblau, 0,25 Oxalsäure in 100,0 Wasser). Devaux (s. Pektinm.) färbt mit Berlinerblau und dann die verholzten Membranen mit Safranin oder Jodgrün. Die Speicherung der Metalle soll nicht der Zellulose, sondern den Pektinen zukommen. Zur Erlangung starker Färbungen muß man die Präparate erst mit Kalilauge behandeln. Petit[2]) wendet Bleiazetat und Kaliumdichromat an (die dünnen Wände werden gelb, ebenso färbt Ferrichlorid und Ammoniumsulfat), dann folgt Alkannafärbung (Kork, Kutikula rot) und schließlich Behandlung mit verdünntem wässerigen Jodgrün (Holz grün).

Tompa[3]) benutzt die Reduktion von Goldlösung durch Zinnchlorür (Bildung von Cassiusschem Purpur). Die Präparate von Alkoholmaterial (von frischem nach zweitägiger Alkoholbehandlung) kommen auf 24 Stunden in schwache Zinnchlorürlösung (0,5 ccm konzentrierte Lösung[4]) in 10 ccm Wasser), werden mit durch verdünnte Salzsäure schwach angesäuertem Wasser abgespült und dann auf 10—30 Sekunden in eine 0,1proz. wässerige, mit verdünnter Salzsäure angesäuerte und auf 25° erwärmte Lösung von Aurum chloratum flavum gebracht. Nun folgt Abspülen mit schwach saurem Wasser, Glyzerinwasser (1 Tag), Weingeist steigender Konzentration, Chloroform, Chloroformbalsam. Unverholzte Membranen nehmen Purpurfarbe an. Dieselbe Methode verwendet Haller[5]) für die Bastfasern von Jute, Hanf, Flachs und Typha und findet, daß die Ablagerung des Cassiusschen Goldpurpurs vornehmlich in der Mittellamelle erfolgt. Bei der Baumwolle färbt sich die Kutikula dunkelrot, stellenweise auch der Lumeninhalt, die Wand bleibt ungefärbt.

E. W. Schmidt (l. c. S. 917, 1) hat das Tompasche Verfahren zum Nachweis von Tüpfel-Schließhäuten ein wenig abgeändert. Er bringt die Handschnitte (Mikrotomschnitte eignen sich schlecht) zunächst in Javellesche Lauge, wäscht sie gut mit angesäuertem Wasser aus und bringt sie nach Abspülen mit destilliertem Wasser bis 48 Stunden

---

[1]) Ed. Strasburger, Bot. Prakt., 1887, 1. Aufl., S. 622.

[2]) L. Petit, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1903, XX, S. 380.

[3]) A. v. Tompa, Zwei botanische Tinktionsmittel, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1903, XX, S. 24.

[4]) Zinnmetall (bleihaltige Stanniolfolien können ebenfalls benutzt werden) im Überschuß wird mehrere Stunden in verdünnter Salzsäure gekocht; die Lösung nebst Bodensatz, in gut schließendem Glase aufbewahrt, ist lange Zeit haltbar.

[5]) Haller, Eine neue Reaktion zur Differenzierung der Mittellamelle der Bastfasern, Textile Forschung, 1920, II, S. 22, Ref. in Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1921, XXXVIII, S. 311.

in das Zinnchlorür, bis 5 Minuten in das Goldbad. Für die Überführung aus dem Zinnchlorür in das HCl-Wasser und von da in das Goldbad soll eine besondere Glasnadel genommen werden, die jüngsten Stadien der Schließhaut lieferten mit Rutheniumrot gute Färbungen. Bei der Färbung mit Saflor-Berlinerblau-Alkanna wird gleichfalls Alkoholmaterial (d. i. von Gerbstoff befreites) benutzt. Die Schnitte kommen in Saflortinktur[1]) (aus Crocus officinalis L. bereitet, gemeint ist wohl C. sativus L.?), dann nach dem Abwaschen mit Wasser auf 15—30 Sekunden in 0,25proz. wässeriges Ferrichlorid und nach leichtem Abspülen mit destilliertem Wasser in 0,5proz. wässeriges gelbes Blutlaugensalz; nun folgt Abwaschen mit angesäuertem Wasser, Einlegen in heiße Alkannalösung (einige Sekunden), Abspülen, wässeriges Glyzerin, Glyzeringelatine. Kork, Kutikula rot, dickwandige und verholzte Wände gelb, dünne Membranen blau.

Haller[2]) untersuchte das Fixierungsvermögen der rohen Jutefaser und der rohen und gebleichten Baumwollfaser gegenüber Salzen und fand, daß die Bastfasern mehr Affinität zu Metallsalzen haben, als die rohe Baumwollfaser. Ergebnisse: Ammonchlorid (Fixierung nicht nachweisbar), Kalziumnitrat (Nachweis mit siedender weingeistiger Purpurinlösung), Uranylazetat (geringe Fixierung nur bei Jute), Titantrichlorid (Jutemembran durch Tanninlösung homogen orange), Merkuronitrat (starke Fixierung in der Mittellamelle der Jute, Nachweis mit Natriumsulfid), Bleinitrat (mit Kaliumjodid Gelbfärbung der Jutemembran durch sehr fein verteiltes Bleijodid), Wismutnitrat (starke Einlagerung), Antimonylkaliumtartrat (starke Einlagerung in den rohen Fasern, mit Natriumsulfid intensive Orangefärbung), Zinnchlorür (Nachweis mit Goldchlorid, differenzierte Färbung der Mittellamelle und Kutikula), Palladiumchlorür (starke Einlagerung).

Callose

Als Callose bezeichnete Mangin[3]) zunächst den Stoff, aus welchem die Callusbelege der Siebröhren bestehen. Da man auch in anderen Membranen Stoffe findet, welche sich gegenüber Reagentien, wie die Callose der Siebröhren verhalten, so wurde sowohl von Mangin als von Anderen Callose auch außerhalb der Siebröhren angegeben. Sie soll sich in der Grundsubstanz der Cystolithen finden, in mit Kalziumkarbonat inkrustierten Wänden (besonders der Trichome), in der Zellmembran der Grünalgen (Panini), in Pollenkörnern (zwischen Intine und

---

[1]) Die Bezeichnung gibt zur Verwechslung Anlaß. Unter Saflor versteht der Handel Flores Carthami (Carthamus tinctorius).

[2]) Haller, Untersuchungen über die Fixierung von Metallsalzen durch pflanzliche Gespinstfasern, Der Textilchemiker und Kolorist, 1920, Nr. 8 und 9; Ref. in Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1921, XXXVIII, S. 310.

[3]) L. Mangin, Observ. s. présence de la callose chez les Phanerogames Bull. Soc. bot. de France, 1892, 260 und Nouv. obs. s. callose, Compt. rend., 1910, CLI, 279.

Exine), bei Coniferen, Cyperaceen, Iuncaceen (Lit. S. 191, 3 und 908, 1), Pollenschläuchen (innerste Lamelle) und in vielen Pilzen. Nach C. Howe besteht die innere Zellwandschicht der Wurzelhaare aus Callose.

Mangin gibt für die Callose folgende Eigenschaften an: Sie ist unlöslich in Alkalien, verdünnten Säuren und dem Schweizerschen Reagens und gibt mit Brom eine in verdünnten Alkalien lösliche Verbindung. Aus diesen alkalischen Lösungen wird durch Säuren eine viskose Substanz gefällt. Callose besitzt die Elementarzusammensetzung der Zellulose und liefert durch Hydrolyse Glykose. Sie unterscheidet sich von Zellulose (und Chitin) dadurch, daß sie durch Glyzerin 300° rasch zerstört wird. Sie färbt sich nicht durch Jodreagentien. Dagegen wird sie durch blaue Farbstoffe der Triphenylmethan-Trisulfonsäuregruppe in saurem Bad und durch Benzidinfarbstoffe in alkalischem Bad gefärbt.

Demgegenüber hat E. W. Schmidt[1]) dargetan, daß Mangin mit dieser Definition zwei in ihrer Zusammensetzung unbekannte Stoffe unter einen Begriff gebracht hat, nämlich die Siebröhren-Callose und einen besonders in den Pilzen verbreiteten Membranstoff, der deshalb Pilz-Callose genannt sei.

1. Die Siebröhren-Callose

Die Siebröhren-Callose ist unlöslich in Schweizers Reagens, kalten Alkalikarbonaten und kalter verdünnter Salpetersäure, in der sie jedoch ein wenig quillt, während sie in heißer verdünnter Salpetersäure sehr stark quillt; unlöslich auch in Essigsäure. Durch einmaliges Erhitzen mit konzentrierter Salpetersäure bis zum schwachen Aufkochen wird sie gelöst.

Sie ist leicht löslich in 1proz. Alkalilauge, konzentrierter Schwefelsäure, Chromsäure, Eau de Javelle, konzentriertem Zinnchlorür, Kalziumchlorid.

Sie quillt in Chloralhydrat, Chloraljod, Chlorzinkjod, kalter konzentrierter Salpetersäure. Sie wird durch mehrstündige Einwirkung von 5proz. Schwefelsäure bei 90° nicht hydrolysiert (Unterschied gegenüber Hemizellulosen).

Callose wird nicht angegriffen von Ptyalin, Papayotin, Trypsin, Pepsin, Bakterien und Penicillium glaucum (E. W. Schmidt).

Siebröhren-Callose färbt sich mit Jodjodkalium gelb bis braungelb, mit Chlorzinkjod rotbraun.

---

[1]) E. W. Schmidt, Bau und Funktion der Siebröhren der Angiospermen (Jena 1917, Gustav Fischer).

Zum Nachweis stehen Färbungen in erster Reihe. Mit Pikrinsäure färbt sich Callose gelb; auch Kongorot färbt, dagegen nicht Eosin (Chalon).

Russow (Lit. S. 866, 5) empfahl Anilinblau. Die Schnitte verweilen längere Zeit (20—40 Minuten) in verdünntem wässerigem Anilinblau und werden mit Glyzerin ausgewaschen. Man kann mit wässerigem Eosin (einige Minuten) nachfärben (Siebröhreninhalt und Plasmodesmen rot, Calloseplatten blau). Die Färbungen halten sich in Glyzerin, Glyzeringelatine und Kanadabalsam. Vielfach benutzt wird Corallin-Soda (Szyczylowicz [Bot. Zentralbl., XII, 113], Corallin in konzentrierter wässeriger Natriumkarbonatlösung); der Farbstoff färbt in kurzer Zeit oder man überfärbt und wäscht mit 5proz. Soda aus, wodurch Entfärbung eintritt und nur die Callose gefärbt bleibt (nicht haltbar).

Azofarbstoffe, die in neutralem oder schwach saurem Bade die Zellulose stark färben, lassen die Callose ungefärbt (Orseillin BB, Azorubin, Naphtholschwarz, Crocein). Hingegen wird die Callose von Farbstoffen der Benzidinreihe (Kongorot, Deltapurpurin, Brillantpurpurin, Benzopurpurine, Heliotrop, Benzoazurin) in neutralem oder schwach alkalischem Bade kräftig gefärbt (ebenso Zellulose)[1]. Für Blätter wird nachstehendes Verfahren gegeben: Zentimeterbreite Stücke werden zur Verjagung der Luft einige Minuten in Weingeist gekocht und nach dem Erkalten auf einige Zeit in Salpetersäure gebracht, so daß sie völlig von der Säure bedeckt sind; dann werden sie mit Wasser ausgewaschen, zur Vertreibung der Luft mit Weingeist erwärmt und 2—3mal mit schwachem Ammoniak übergossen, bis das Gewebe farblos und durchsichtig geworden ist. Nun folgt Neutralisation mit 3proz. Essigsäure und Färbung mit einem Gemisch von Brillantblau, Anilinblau (oder einem anderen blauen, wasserlöslichen, von trisulfonierten Triphenylrosanilinen abstammenden Farbstoff) und mit Bismarckbraun in 3proz. Essigsäure oder in 3proz. Ameisensäure (stickstoffhaltige Körper und Kutikula braun, Callose grünblau).

Resoblau (oder auch eine mit Borax oder Ammoniak versetzte Lösung des käuflichen Lakmoids, die aber wenig haltbar ist) färbt in 30—60 Sekunden nur die Callose intensiv blau, später auch das Holz (Protoplasma und Kern färben sich schwarz). Eine Auflösung von 20, g Kongorot in 100 g Resoblaulösung färbt Zellulose rot, Callose blau. Eine dreifache Färbung erhält man, wenn man Schnitte erst mit dem Reagens von Chodat (einer schwach ammoniakalischen

---

[1]) L. Mangin, Sur les réactifs colorants des substances fondamentales de la membrane, Compt. rend., 1890, CXI, 120.

Lösung von Chrysoidin und Kongorot) während einer Minute und dann ½ Minute mit Resoblau behandelt. Zellulose wird rot, Holz, Kork und Kutikula färben sich gelb, während Callose wieder blau wird. Man kann auch zunächst mit Safranin färben, dann nach sorgfältigem Waschen mit Resoblau.

In Glyzerin halten sich die Färbungen mit Resoblau nicht, dagegen bis zu sechs Monaten in konzentrierter Lösung von Kaliumazetat und Hoyerscher Flüssigkeit, auch in Kanadabalsam[1]).

Resoblau erhält man, wenn man eine Lösung von 1 Teil Resorzin in 100 Teilen Wasser und 1 Teil konzentriertem Ammoniak mehrere Tage an der Luft stehen läßt.

2. Die Pilz-Callose (Fongose)

Die Pilz-Callose soll sich von der Siebröhren-Callose durch ihre Unlöslichkeit in Javellescher Lauge unterscheiden, nach Tanret[2]) auch dadurch, daß sie sich unmittelbar in verdünnter Lauge löst, während die Siebröhren-Callose sich nur lösen soll, wenn sie damit wiederholt behandelt wird. Die Angaben über die Löslichkeit der Siebröhren-Callose widersprechen sich aber (s. oben), so daß eine klares Bild über die Verschiedenheit der beiden Callosen nicht erhalten werden kann.

Hier sei eingefügt die Fixierung des Inhalts lebender Siebröhren. Bei Präparation lebenden Materials wird der Inhalt der Siebröhren aus den mit relativ großen Öffnungen kommunizierenden Röhren zum Teil herausgepreßt; es entstehen Kunstprodukte, meist erscheint nur an einer Seite der Siebplatte der Inhalt als sog. „Schlauchkopf". Um den lebenden Zustand zur Anschauung zu bringen, taucht man (A. Fischer, Inhalt der Siebröhren in unverletzten Pflanzen, Ber. d. bot. Ges., 1885, III, 230) lebende Pflanzen oder größere unverletzte Zweige in siedendes Wasser (2—5 Minuten). Der Siebröhreninhalt gerinnt. Zur besseren Präparation läßt man die abgebrühten Pflanzen, in kleinere Stücke zerschnitten, einige Stunden in Weingeist-Glyzerin liegen. Fischer unterscheidet verschiedene Modifikationen des Inhaltes: Siebröhren: a) mit gerinnbarem Saft (Cucurb., ein schwacher protoplasmatischer Wandbelag umschließt einen klaren, in der Hitze gerinnenden Saft); b) mit Schleim (Humulus, ein zarter, schleimführender Wandbelag umschließt den klaren, nicht gerinnenden Inhalt); c) mit Stärkekörnern (Coleus, der Wandbelag führt nur geringe Schleimmengen, im klaren, nicht gerinnenden Inhalt kleine Stärkekörnchen).

E. W. Schmidt (l. c. S. 917, 1) ging folgendermaßen vor: Er schabte die epidermale Schicht vorsichtig mit einem scharfen Messer ab, schob einen Glaszylinder über die so vorbereitete Stelle und verschloß dessen unteres Ende mit zwei halbrunden Korkstückchen und Wachs. Dann

---

[1]) Tswett, Compt. rend. Acad. sciences, 1911, CLIII, S. 503.

[2]) Tanret, Sur les rélations de la callose avec la fongose, Compt. rend. Acad. sciences, 1910, CLI, S. 447.

wurde das Fixiermittel eingegossen, vorzugsweise starke Flemmingsche Lösung, daneben auch Sublimat-Alkohol, Carnoysche Flüssigkeit, Juelsche Flüssigkeit und absoluter Alkohol.

Die Lichtzone

Die Palisaden vieler Samen (die Zellen der Palisadenschicht, Prismen-, Hartschicht) zeigen dicht (Pisum, Abrus) oder doch nahe der Kutikula (Trigonella, Fig. 178) eine in gleicher Höhe verlaufende Querzone, die das Licht stärker durchläßt und sich scharf von der benachbarten dunkler erscheinenden Membran abhebt. Diese Lichtlinie (besser Lichtzone, Tschirch), die nicht an Querschnitten sichtbar ist (Junovicz)[1], findet sich bei Samen der Legumin., Malvac., Geraniac., Cannac., Tiliac., Sterculiac., Cucurbit., Labiaten, Mimosen, Convolvul., Bixaceen u. a. (Lit. S. 162, 5). Zuweilen sind zwei Lichtzonen vorhanden (Junovicz, Russow). Trotzdem die Lichtzone schon von Malpighi (1675) beobachtet und von Schleiden (1838) abgebildet worden ist, wurde sie noch von Hanstein (1866) völlig verkannt, und auch jetzt sind wir nicht genügend über sie unterrichtet.

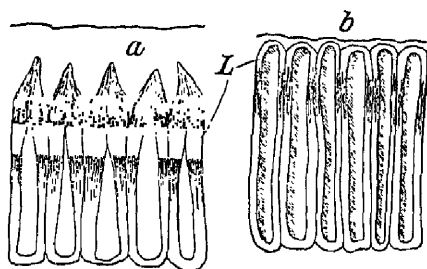



Fig. 178. Lichtzone (*L*) der Samenpalisaden, (*a*) von *Trigonella foenum graecum*, (*b*) von *Pisum sativum* (Tunmann)

Die Lichtzone wurde von Russow[2]) auf physikalische Ursachen zurückgeführt, die Membran sollte dort „dichter, wasserärmer“ sein. Nur zum Teil schließen sich ihm hierin Lohde (Lit. S. 162, 4) u. a. an, während Wettstein[3]), Sempolowski[4]) u. a. einen verschiedenen Wassergehalt verneinen. Nach Junovicz ist die Lichtzone auf eine „für starke Lichtbrechung günstige Molekularzusammensetzung zurückzuführen“. Für chemische Ursachen trat Lohde ein (seine Angabe über die Kutikularisierung der Zone ist aber unrichtig). Wahrscheinlich liegen morphologische und chemische Ursachen vor.

In anatomisch-physiologischen Arbeiten wird die Lichtzone oft erwähnt, aber nicht näher untersucht. Mehrfach finden sich Hinweise auf Befunde von Pfaefflin[5]). Dieser sagt aber nur, daß sie „besonders deutlich hervortritt, wenn man Schnitte kurze Zeit in Farbstofflösungen

[1]) R. Junovicz, Die Lichtlinien in den Prismenzellen der Samenschalen, Sitzgsber. Wien. Akad., 1878, LXXVI$_1$, S. 335.

[2]) E. Russow, Mém. de l'Ac., St. Pétersbourg, 1873, 7, XIX, S. 33.

[3]) R. v. Wettstein, Verh. zool.-bot. Ges., Wien 1888, XXXVIII, S. 41.

[4]) A. Sempolowski, Bau der Samenschale, Diss., Leipzig, S. 11.

[5]) P. Pfaefflin, Entwicklung, Bau und Funktion der Nabelspalte usw. praktisch wichtiger Papilionaceen-Samen, Diss., Bern 1897, S. 35.

legt, wodurch die Lichtlinie sich als ungefärbt von der umgrenzenden gefärbten Partie abhebt". Beweiskräftiger für einen besonderen Chemismus der Lichtzone sind die Reaktionen mit Jodschwefelsäure und Chlorzinkjod, die von Sempolowski, Junovicz u. a. übereinstimmend erhalten wurden. Während die nicht lichtbrechenden Teile sofort blau oder violett werden, bleibt die Lichtzone zunächst ungefärbt, wird dann langsam gelb und bläut sich erst nach längerer Zeit. Sie verschwindet „nach längerem Kochen in Kalilauge" (Sempolowski). Bei der Säurehydrolyse hat Tunmann keine Veränderung bemerkt, so daß er, da Hemizellulosen nicht vorliegen, einen Gehalt an Pektin oder an calloseartigen Stoffen anzunehmen geneigt war. Bei Einwirkung starker Reagentien (Salpeter-, Chrom-, Schwefelsäure) wird zuerst die Lichtzone gelöst, der darüberliegende Teil der Prismenzellen hebt sich ab.

Des weiteren ist die Lichtzone „sowohl von der Molekularzusammensetzung, als auch vom anatomischen Bau der Zelle und von der Art der Zellwandverdickung abhängig" (Junovicz) und schon Russow fand, daß die Verdickung der Wand an dieser Stelle zuerst einsetzt (Entstehung stark lichtbrechender Wülste).

Hemizellulosen[1])

Unter Hemizellulosen versteht man diejenigen Membran-Polysaccharide, die im Gegensatz zur Zellulose sich leicht mit verdünnten Säuren hydrolysieren lassen und dabei nicht lediglich Glykose liefern. Es ist keine scharf abgegrenzte Gruppe und manche Forscher rechnen auch die Pektinstoffe (s. S. 928) dazu. Die Hemizellulosen sind teils Gerüstsubstanzen, teils Reservestoffe. Unter den Hydrolyseprodukten der Reservestoff-Hemizellulosen ist die Mannose erwähnenswert.

Die Reservestoff-Hemizellulosen verleihen dem Endosperm die bekannte harte Konsistenz und treten häufig in Gemeinschaft mit Zellulosen auf; teils überwiegen Hemizellulosen, teils Zellulosen. Wir finden sie in Samen (Gramin., Palmen, Liliaceen., Oleaceen, Loganiaceen, Papilionaceen, Plantag. u. a.), in den sekundären Membranen mechanischer Elemente, des Leptoms und Parenchyms. Die innere Verdickungsschicht der Fasern (die Gallert- oder Knorpelschicht Sanios, Lit. S. 50, 1) besteht bei unseren Sträuchern und Bäumen meist aus Hemizellulosen (Leguminosen, Gnetaceen, Sterculiaceen, Urticaceen, Dipterocarpeen, Thymelaeceen, Tiliaceen u. a., Aisslinger, Lit. S. 889, 1); im Leptom und im Grundparenchym vieler Knospen (Schaar)[2]), selbst im Wurzelstock (Plantago alpina und montana, Schellenberg)[3]) sind Hemizellulosen gefunden worden.

---

[1]) E. Schulze in zahlreichen Arbeiten seit 1889 in Ber. chem. Ges., Zeitschr. physiol. Chem. u. Ber. bot. Ges.

[2]) F. Schaar, Reservestoffbehälter der Knospen von Fraxinus excelsior L., Sitzgsber. Wien. Akad., 1890, $XCIX_1$, Sep.

[3]) H. C. Schellenberg, Über Hemizellulosen als Reservestoffe bei unseren Waldbäumen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 36.

Ein Teil der Hemizellulosen, zur Inkruste gehörig, ist nach Schmidt, Haag und Sperling an dem von Chlordioxyd angreifbaren (s. S. 895) Membranbestandteil, ein anderer zur Skelettsubstanz gehörig, an die Zellulose, bzw. das Chitin gebunden. Die bisher untersuchten Hemizellulosen, die an die Zellulose gebunden sind, tragen Karboxylgruppen, die der Glykuronsäure zukommen; die Galakturonsäure vermittelt die Bindung von Hemizellulosen mit dem von Chlordioxyd angreifbaren Membranbestandteil.

Nach Ehrlich[1]) ist eine Entstehung von Hemizellulosen aus Bestandteilen des Pektins (Tetragalakturonsäure, Polygalakturonsäure) in Betracht zu ziehen.

Durch die Löslichkeit der Hemizellulosen in Wasser (Ehrlich und Schubert) oder Sulfit (Schmidt und Mitarbeiter) einerseits, in Natronlauge andererseits lassen sich mindestens zwei Arten von Hemizellulosen analytisch voneinander unterscheiden (Schmidt, Meinel und Zintl).

Chlordioxyd wirkt auf Hemizellulosen nicht merkbar ein.

Nach König werden Hemizellulosen durch Dämpfen mit Wasser bei 1 bis 2 Atmosphären Druck gelöst.

Die in den Membranen aufgespeicherten Hemizellulosen werden im Herbste aus Stärke gebildet (A. Fischer, Lit. S. 294, 2), die der Samen aus zugeführten Hexosen. In den vegetativen Teilen kann die Hemizellulose nur in jenen Zellen gelöst und nutzbar gemacht werden, die noch einen lebenstätigen Plasmakörper besitzen. Die Lösung geschieht auf enzymatischem Wege. Im Libriform wurde Auflösung von Hemizellulosen beobachtet in Weidenstecklingen (Leclerc du Sablon[2]), bei Vitis vinifera und Robinia, nicht aber bei Fagus, Quercus, Fraxinus, Corylus, Alnus, Schellenberg), ferner im Gewebe der Knospen bei Fraxinus excelsior (Schaar), Betula, Alnus, Aesculus, Corylus (Schellenberg). In den Bastfasern sind sie meist Baustoffe (Tilia), bei Ficus coronata Reservestoffe (Aisslinger). Bei der Keimung der Samen wird im Endosperm oft die gesamte Membran gelöst, während im Keimling nur die Verdickungsschichten abschmelzen.

Ist schon in makrochemischer Hinsicht unsere Kenntnis der Hemizellulosen noch unzureichend, so sind wir in der Mikrochemie nur auf wenige Reaktionen angewiesen. Reiss gab noch an, daß die von ihm aus Phoenix dactylifera, Phytelephas und anderen Samen isolierten Reservezellulosen sich mikrochemisch nicht von Zellulose unterscheiden lassen. Wir bezeichnen derzeit alle nicht verkorkten und nicht verholzten Membranen, die sich durch Kochen mit verdünnten Säuren hydrolysieren lassen, als Hemizellulosen (s. unten). Konzentration der

---

[1]) F. Ehrlich, Über die Chemie des Pektins und seine Beziehungen zur Bildung der Inkrusten der Zellulose, Zeitschr. angew. Chem., 1930, XLIII, S. 177.

[2]) Leclerc du Sablon, Rech. phys. sur les matières de réserve des arbres, Rev. gén. de Bot. 1904 u. Compt. rend., 1898, CXXVII, S. 968.

Säure und Dauer der Einwirkung muß von Fall zu Fall erprobt werden. Meist genügt ein ½—1stündiges Kochen mit 5proz. Salzsäure oder ein 2½stündiges Kochen mit 2½proz. Schwefelsäure. Grüss (Lit. S. 686, 1) hydrolysiert (Libriform der Amygdalaceen) durch 12stündiges (und längeres) Kochen bei nur 70—75^0 in einem mit dem Rückflußkühler versehenen Kolben mit verdünnter Schwefelsäure (1,5 ccm Säure, 100 ccm Wasser). Auch geeignete Enzyme kann man benutzen, so löst die im Kirschgummi enthaltene Cytase (S. 686) das Galaktan des Libriforms der Amygdalaceen. Durch Prüfen der Kochflüssigkeit mit Fehling kann festgestellt werden, daß beim Kochen mit der verdünnten Säure die Hemizellulosen in Zucker übergeführt wurden. Zu diesem Zwecke müssen aber aus den Präparaten vor der Hydrolyse die Zellinhalte entfernt werden. Vorteilhaft wählt man stärke- und glykosidfreie Gewebe oder man trennt auf mechanischemWege die betreffenden Elemente ab, was bei Fasern ausführbar ist. Bei Samen genügt in vielen Fällen (Strychnos) zur Hydrolyse ein kürzeres Aufkochen (3—5 Minuten) in verdünnter Säure unter Deckglas.

Nach dem Kochen und dem Auswaschen der Präparate wird die Wirkung der Hydrolyse festgestellt. Die Membranen sind teils abgeschmolzen, teils zeigen sie Risse und Sprünge. Bei starker Hydrolyse erfolgt auch ein körniger Zerfall. Bei anderen Objekten erscheinen die Membranen in ihrer ursprünglichen Stärke, besonders wenn die Hemizellulosen mit Zellulose oder mit „Holz" verbunden sind. Bei Heranziehung von Vergleichspräparaten findet man dann oft, daß die Membran hyalin und ihr Lichtbrechungsvermögen ein anderes geworden ist. Die durch die Hydrolyse bewirkten Veränderungen gleichen denen, die in der Pflanze durch Enzyme bei der Mobilmachung der Reservestoffe stattfinden. Doch muß in allen Fällen die Herauslösung der Hemizellulose durch mikrochemische Reagentien festgestellt werden. Optische Betrachtung und Messen der Wandstärke allein können nicht immer einen sicheren Aufschluß geben.

Die Membranen werden vor und nach der Hydrolyse mit Jodreagentien, Kupferoxydammoniak und mit Farbstoffen geprüft. Da verschiedene Hemizellulosen vorliegen, so werden die Reaktionen verschieden ausfallen. Einige werden von Jodjodkalium oder Chlorzinkjod gefärbt (selbst vor der Hydrolyse), andere wiederum nicht. Seit langem bekannt ist die Blaufärbung des Amyloids sowie der Galaktane und Mannane mit Jodreagentien (vgl. auch S. 925). Die Jodreaktionen hängen nicht nur von der Beschaffenheit der Membran, sondern auch von der der Reagentien ab. Oft reagieren die Membranen erst nach längerer Einwirkung (mehrere Tage). Auch das Alter der Reagentien ist von Einfluß (ihr Gehalt an Jodwasserstoffsäure). Im

allgemeinen färbt eine mehrere Jahre alte Chlorzinkjodlösung (mit überschüssigem Jod) stärker und schneller als eine frisch bereitete Lösung. Nicht mit Chlorzinkjod reagiert die Hemizellulose im Samen von Plantago. Nach Schellenberg (Lit. S. 810, 1) besteht die Membran im Plantago-Samen aus $^2/_3$ Hemizellulose und $^1/_3$ Zellulose. Die Membran nimmt während der Keimung an Stärke nicht ab, verliert jedoch ihr Lichtbrechungsvermögen und ändert ihr reaktionelles Verhalten. Im ruhenden Samen wird die Membran von Jodlösung nicht, von Chlorzinkjod nur sehr schwach violett gefärbt. Während der Keimung werden die Hemizellulosen gelöst und die Chlorzinkjodreaktion tritt nun um so schärfer ein, je mehr Hemizellulosen herausgelöst wurden. Die gleiche Wirkung erzielt man durch Kochen mit 5proz. Salzsäure. Die in den Fasern von Daphne pendula mit Holzsubstanz verbundene Hemizellulose färbt sich mit Chlorzinkjod (Aisslinger). Die Fasern geben mit Chlorzinkjod eine rotviolette Färbung und gleichzeitig schwache Verholzungsreaktion. Nach dem Kochen mit der Säure gibt Chlorzinkjod nur Gelbfärbung, die Phloroglucinreaktion tritt schärfer ein. Ein gleiches Verhalten zeigt die Jutefaser. Die Haare, welche die verkümmerten Samen von Musa einschließen, färben sich nur schwach mit Chlorzinkjod, kräftig mit verdünnter und starker Jodjodkaliumlösung. Nach der Hydrolyse färbt Jod schwach blau, Chlorzinkjod schwach rötlich (Jähkel)[1]. Die Reservezellulose der Kerne der Dattel besteht vorzugsweise aus Galaktomannan; dieses wird von Chlorzinkjod blauviolett, von Jodphosphorsäure gelb, von Kongorot hellrot gefärbt. Ein gleichzeitig auftretendes β-Mannan bleibt in Chlorzinkjod farblos. Die Galaktan-Natur der Libriformverdickungen der Prunaceen kann durch Bildung von Schleimsäure ermittelt werden. „Die dünnen Späne wurden mit Wasser, Weingeist und Äther gereinigt, mit der zwölffachen Menge Salpetersäure (spez. Gew. 1,15) erhitzt und auf ein Drittel des Volumens eingedampft. Nach 24 Stunden fielen aus der filtrierten Lösung die charakteristischen Kristalle von Schleimsäure nieder“ (Grüss, Bot. Centralbl., 1887, LXX, 242).

Aus einer Arbeit von Mitchell[2] über die Hemizellulosen von Endospermen und Kotyledonen geht folgendes hervor: In dem Verhalten gegen die Jodreagentien bestehen große Verschiedenheiten. Beispielsweise werden die Hemizellulosen des Endosperms von Coffea arabica, Phoenix dactylifera und Strychnos nux vomica und der Keimlinge von Lupinus hirsutus und Tropaeolum majus durch Chlorzinkjod blau gefärbt, nicht aber die Hemizellulosen der

---

[1]) P. Jähkel, Über Anatomie und Mikrochemie der Bananenfrucht und ihre Reifungserscheinungen, Kieler Dissert., 1909, S. 23.

[2]) E. M. Mitchell, A microchemical study of hemicelluloses of endosperms and cotyledons, Americ. Journ. of Bot., 1930, XVII, S. 117.

Endosperme von Iris pallida, Asparagus Sprengeri und Diospyros virginiana und der Kotyledonen von Primula officinalis und Impatiens balsamina.

Die Mehrzahl der untersuchten Hemizellulosen gab Pentosen-Reaktionen.

Wasserstoffperoxyd (3—6%) löst manche Hemizellulosen der tertiären Membranen in 2—10 Tagen auf; es kann deshalb nicht zur Unterscheidung von Hemizellulosen und Pektinstoffen gebraucht werden.

Die Hemizellulosen der Zellwände der Keimlinge von Lupinus hirsutus und Primula officinalis lösen sich, wenn man sie erst mit 2—5proz. Salzsäure bei 80° und dann in der Kälte 1½ Stunden mit 2proz. Kalilauge behandelt.

Kupferoxydammoniak wirkt verschieden, Araban und Xylan wird gelöst, meist auch Amyloid. Über die Aufnahme von Farbstoffen liegen Erfahrungen von Grüss (Bibl. bot., 1896, Heft 49) vor. Heinricher (Lit. S. 910, 3) fand, daß amyloidhaltige Membranen (Samen von Impatiens), die sich nicht mit Chlorzinkjod färbten, Kongorot aus wässeriger Lösung speicherten. Hingegen widerstehen viele Hemizellulosen nicht heißem Glyzerin bei 300° (eine Ausnahme bildet Amyloid, van Wisselingh, Lit. S. 910, 1).

Über die Färbung der Hemizellulosen mit Anthocyan s. S. 984.

Amyloid[1])

Unter Amyloid versteht man Membranstoffe, die sich mit Jod blau färben. Sie sind in der Natur weit verbreitet[2]), besonders in Siebteilen, Kollenchymen, Hypodermen, Zwickeln, besonders auch in wachsenden Zellwänden. Von besonderen Vorkommen seien die Amyloidfenster an den Narben von Alopecurus und Phleum erwähnt, durch die der Pollenschlauch eintritt; sie finden sich ferner in den Wandungen der Sporenmutterzellen, Peristomzähne und des annulus der Laubmoose. Sehr gut eignen sich nach Ziegenspeck zum Nachweis des Amyloids die Knoten der jugendlichen Halme der Gramineen, wo sich die Siebteile mit

---

[1]) J. M. Schleiden, Über das Amyloid, eine neue Pflanzensubstanz, Beitr. z. Bot., 1844.

[2]) H. Ziegenspeck, Über Zwischenprodukte des Aufbaues von Kohlenhydratzellwänden und deren mechanische Eigenschaften. Bot. Archiv, 1925, IX, S. 297.

Derselbe, Über durch Jod gebläute Wandstoffe in den Sporophyten der Laubmoose, Bot. Arch., 1926, XV, S. 424.

Derselbe, Über die Amyloidfenster in den Narbenpapillen des Alopecurus und Phleum, Ber. deutsch. bot. Ges., 1926, XLIV, S. 561.

Derselbe, Amyloid in jugendlichen Pflanzenorganen als vermutliches Zwischenprodukt bei der Bildung von Wandkohlenhydraten, Ber. deutsch. bot. Ges., 1919, XXXVII, S. 273.

Derselbe, Das Amyloid jugendlicher Organe. Das Amyloid in den wachsenden Wurzelhaaren und seine Beziehungen zum Zellwachstum, Ber. deutsch. bot. Ges., 1920, XXXVIII, S. 328.

Jod bläuen, ebenso viele Lycopodium-Arten. Schon lange bekannt sind die Reserveamyloide mancher Samen, z. B. von Tropaeolum.

Nach Ziegenspeck sind die Amyloide Zwischenprodukte des Membranaufbaus in der Reihenfolge: einfach brechendes Amyloid, doppelt brechendes Amyloid, Collose, Zellulose. Sie treten in den meisten Membranen nur vorübergehend auf, können aber in bestimmten Fällen teils wegen ihrer leichten Verarbeitbarkeit (Tracheen-Zwischenwände, Reservestoffe) oder wegen ihrer großen Dehnbarkeit (bei geringer Elastizität Amyloid, bei größerer Collose) erhalten bleiben. Chemisch sind sie nicht einheitlich. Die Blaufärbung mit Jod kann nur zur Kenntnis eines gewissen kolloiden oder chemischen Zustandes der Membran dienen. Gemeinsam ist den Amyloiden die geringe Widerstandsfähigkeit gegen verdünnte Mineralsäuren. Aus Querschnitten durch Lycopodium selago und L. clavatum verschwinden sie schon nach einstündigem Verweilen in 90° warmer 5proz. Schwefelsäure. Manche Amyloide werden durch Cytasen angegriffen. Safranin, Korallinsoda und Kongorot werden durch die amyloidhaltigen Siebröhren von Lycopodium clavatum und L. selago gespeichert, dagegen nicht Anilin- und Methylenblau, Hämatoxylin und Rutheniumrot.

Als Ab- oder Aufbauprodukt der Zellulose ist Amyloid wahrscheinlich bei Algen verbreitet (Steinecke)[1].

Prüfung auf Amyloid nach Ziegenspeck:

Die nicht zu dünnen Schnitte kommen zunächst in Weingeist, dann in Wasser. Ein Schnitt wird zur Kontrolle sofort in Jodlösung[2]) betrachtet, die anderen nach kurzer Vorbehandlung mit Javellescher Lauge[3]) und gründlichem Wässern.

Ist es erwünscht, die Stärke zu entfernen, so pinselt man entweder sehr dünne Schnitte aus oder man verdaut nach Vorbehandlung mit Javellescher Lauge und Verkleistern mit Speichel oder Diastase bei 36°. Rascher entfernt man die Stärke durch Aufkochen mit 0,15proz. Salzsäure (Kontrolle erforderlich).

Zur Beobachtung: Mikrosummar 24 mm, Apochromat 3 mm, Fluoritsystem 6a und die Ölimmersionen $^1/_{70}$ und $^1/_{16}$ von Leitz. Okulare möglichst schwach, bei zweifelhaften Fällen Kompensationsokulare 2,6 Leitz und 8 Zeiss.

Zum Nachweis amyloidartiger Stoffe entfärbt Steinecke erst mit Weingeist, behandelt dann mit schwacher Chloralhydratlösung und dann erst mit Jodjodkalium.

---

[1]) F. Steinecke, Hemizellulosen bei Oedogonium, Bot. Arch., 1929, XXIV, S. 391.

[2]) Jod 2 Kaliumjodid 1 mit Wasser fein zerrieben, Wasser zu 200 g (A. Meyer). Außerdem werden Choraljod oder Jodzuckerlösung verwendet.

[3]) Durch Einleiten von Chlor in kalte 10proz. Natronlauge zu bereiten.

Lichenin[1])

Lichenin (Flechtenstärke) wurde von Berzelius der gallertbildende Stoff von Cetraria islandica genannt. Nach Karrer ist Lichenin als „Reservezellulose" allgemein verbreitet und steht auch chemisch der Zellulose sehr nahe.

Lichenin löst sich in heißem Wasser, die Lösung gelatiniert beim Erkalten. Jod färbt die wässerige Lösung nicht blau; festes Lichenin wird mit Jod schwarzblau, der enzymatische Abbau kann so geführt werden, daß er über Zellobiose zu Glykose führt. Lichenin ist wie Zellulose optisch-inaktiv, reduziert Fehlingsche Lösung nur äußerst wenig und wird durch Azetolyse in Oktaazetylzellobiose übergeführt.

Lichenin gibt Fällungen mit Phosphormolybdänsäure, Silikowolframsäure und Tannin, nicht mit Brombromwasserstoff (Rosenthaler).

Vom Lichenin unterscheidet sich das Isolichenin — nach Karrer[2]) ein Gemisch — dadurch, daß es schon in kaltem Wasser löslich ist und sich mit Jod bläut.

Zum Nachweis von Lichenin dienen Jodjodkalium und Rutheniumrot. Nach Tschirch[3]) findet sich Lichenin nur in der Membran und zwar vorzugsweise in der Mittelschicht. Diese „ist es in erster Linie, die sich mit Jod direkt blau färbt und beim Kochen mit Wasser sich löst bzw. in eine Gallerte übergeführt wird. Die Färbung mit Jod, die stets nur an den Wänden auftritt, bleibt auch bei alter Droge nur selten aus, wenn man den Schnitt in Jod-Jodkaliumlösung einlegt und dann mit Wasser auswäscht". Andererseits tritt nach Knop und Schnedermann (Lieb. Ann. 1845) die Licheninreaktion auch im Inhalt und zwischen den Hyphen ein und Tobler (Lit. S. 312, 3) hat die Reaktion zwar auch zunächst in der Mittelschicht beobachtet, doch „wurde zuerst der Inhalt der Zellen blau", später bläuten sich die Zellwände des ganzen Thallus mit Ausnahme der Gonidienschicht und der alleräußersten Schichten. Um den Eintritt der Jodreaktion zu beschleunigen, setzt man dem mit weingeistiger Jodlösung behandelten Schnitte Milchsäure zu. Derart hergestellte Präparate behalten die Färbung

---

[1]) Th. Berg, Zur Kenntnis des in Cetraria islandica vorkommenden Lichenins und jodbläuenden Stoffes, Dorpater Diss., 1872 und Pharm. Zeitschr. f. Rußland, 1873, XII, S. 129.

[2]) P. Karrer, B. Joos und M. Staub, Zur Kenntnis des Lichenins II, Helv. chim. Acta, 1923, VI, S. 800; P. Karrer und B. Joos, Das Lichenin, Biochem. Ztschr., 1923, CXXXVI, S. 537.

[3]) A. Tschirch, Handb. d. Pharmakogn., 1912, II, S. 266.

bis 6 Monate[1]). Rutheniumrot gibt Rotfärbung in den Präparaten und färbt auch sofort den isolierten Körper („Isolichenin" Zopf) rot. Lichenin quillt in Wasser und löst sich leicht in Kupferoxydammoniak und in Alkalien.

„Isolichenin" wurde von Ziegenspeck[2]) in den jugendlichen Asci zahlreicher Flechten gefunden.

Pektinmembranen

Das in Wasser unlösliche Urpektin der Pflanzen besteht sehr wahrscheinlich aus einer lockeren schon durch heißes Wasser spaltbaren Verbindung von Araban und dem Kalzium-Magnesiumsalz der Pektinsäure. Das Gemisch beider Stoffe ist das Hydrato-Pektin. Die Pektinsäure $C_{41}H_{60}O_{36}$ ist aufgebaut aus 4 Mol. Galakturonsäure, 1 Mol. Arabinose, 1 Mol. Galaktose, 2 Mol. Essigsäure und 2 Mol. Methylalkohol. Die 4 Mol. Galakturonsäure hängen im Pektin, dessen Hauptkomplex sie bilden, zusammen[3]).

Die Pektine der Orangeschalen, der Johannisbeeren und Erdbeeren sind qualitativ aus denselben Grundkörpern wie das Pektin der Rübenwurzeln aufgebaut, die Orangenpektinsäure z. B. aus 4 Mol. Galakturonsäure, 2 Mol. Methylalkohol, 2 Mol. Essigsäure und je 1 Mol. Arabinose und Galaktose[4]).

Das Urpektin (Inkruste der Bastfaser) des Flachses wird durch Wasser bei höherer Temperatur hydrolysiert zu einem Hexopentosan und dem Hydropektin, dem Ca-Mg-Salz der Pektinsäure. Letztere ist eine Diacetyl-Arabino-Xylo-Galakto-Dimethoxy-Tetragalakturonsäure. Das Hexopentosan ergibt durch Hydrolyse l-Xylose, l-Arabinose, d-Fruktose und d-Galaktose[5]).

Pektine (Braconnot, 1833) sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Sie sind ein Bestandteil der Mittellamellen, die ganz oder teilweise aus pektinartigen Stoffen aufgebaut sind. Nach C. Howe besteht die Außenseite der Zellwand der Wurzelhaare aus Pektin.

Die bei der Zellteilung entstehende Zellplatte (S. 887 unten) spaltet sich in zwei Lamellen, zwischen denen die sog. Mittellamelle zur Ausbildung gelangt (Treub, 1878, Strasburger, 1898 u. a.). Die Mittellamelle (primäre Membran) ver-

---

[1]) F. Tobler, Mitteilungen über Verwendung von Milchsäure zur Beschleunigung und Verbesserung gewisser Jodreaktionen, Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1910, XXVII, S. 366.

[2]) H. Ziegenspeck, Über Jod unter Blaufärbung aufnehmende Stoffe in den Asci von Flechten (Isolichenin), Ber. deutsch. bot. Ges., 1924, XLII, S. 116.

[3]) F. Ehrlich und F. Schubert, Über die Chemie der Pektinstoffe, Tetragalakturonsäuren und d-Galakturonsäure aus dem Pektin der Zuckerrübe, Ber. deutsch. chem. Ges., 1929, LXII, S. 1974 ff.

[4]) F. Ehrlich und A. Kosmahly, Über die Chemie des Pektins der Obstfrüchte, Biochem. Zeitschr., 1929, CCXII, S. 162.

[5]) F. Ehrlich und F. Schubert, Über die Chemie der Inkrusten des Flachses, Biochem. Zeitschr., 1926, CLXIX, S. 13.

bindet (verkittet) die benachbarten Zellen; sie wurde daher von Mohl (Über die Verbindung der Zellen untereinander, Diss., 1835) Interzellularsubstanz genannt. Diese Mittellamelle ist in vielen Fällen in steter Veränderung begriffen. Bei der Bildung der Interzellularen spaltet sie sich und überzieht die Interzellularräume als sog. Auskleidungen (S. 713). Da die Mittellamelle ein Produkt zweier Lamellen ist, so ist ihre Spaltung erklärlich. Größere Gewebelücken entstehen durch Auflösung der Mittellamelle und viele Schleime verdanken ihr ihre Entstehung. Auch dort, wo die Zellen in innigem Verbande verbleiben, läßt sich vielfach eine Veränderung der Mittellamelle feststellen (sie verkorkt im Kork, Tilia), die sich mikrochemisch nur dadurch ermitteln läßt, daß die für die Mittellamelle eigenen Reaktionen nicht mehr eintreten (Sklerenchym, Pteris, Tilia).

Die bei vielen Pflanzen in Interzellularen auftretenden zentrifugalen Wandverdickungen, ebenso die im Schwammgewebe der Blätter von Dieffenbachia-Arten vorkommenden Schleimkugeln bestehen aus Pektinstoffen (Kisser).

Die Kollenchymwände (beobachtet an Solanum lycopersicum) bestehen nach Anderson aus abwechselnden Lagen von Zellulose und Pektin.

Aus Versuchen von Odén[1]) geht ferner hervor, daß saure Pektinsubstanzen, die sehr wenig in Wasser löslich, aber geneigt sind, gelatinöse Kolloide zu bilden, in pflanzlichen Membranen — zum Teil als Kalksalze — allgemein verbreitet sind. Odén glaubt, daß sie als Regulator für den H'- und OH'-Gehalt der in der Pflanze zirkulierenden Lösungen von Bedeutung sind, soweit diese mit den Pektinkörpern in Berührung kommen.

Pektin findet sich immer in den Zellwänden des Meristems von radicula und Wurzel.

Die Mittellamelle in den Zellwänden der Meristeme besteht nicht aus Kalziumpektat, sondern ist wahrscheinlich ein Gemisch aus Pektin und Protein (Tupper-Carey und Priestley).

Für die Eckenverdickungen der Kollenchyme, sowie die nicht kutinisierte Lage der Epidermis von Clivia fand Anderson, daß sie aus abwechselnden mikroskopischen Schichten von Zellulose- und Pektinstoffen aufgebaut sind.

Nach Mangin soll in der jugendlichen Zellwand Zellulose und Pektose vorliegen. Die Pektose löst sich in Kupferoxydammoniak erst nach Vorbehandlung mit verdünnten Alkalien oder verdünnter Salzsäure. Sie geht bei weiterem Wachstum der Membran in Pektinsäure über, die als Kalziumpektat die Mittellamelle der Gewebe bildet. Die sekundäre Membran soll aus Zellulose und Pektinen bestehen, die tertiäre Membran soll Zellulose sein. Von anderer Seite (siehe unten) wird Pektose als Bestandteil der Mittellamelle angenommen. Nach Allen[2]) liegen die Pektine in reinster Form in kräftig wachsenden Zellen und in jugendlichen Holzmembranen vor. Schroeder stellt die Pektine zu den

---

[1]) S. Odén, Zur Frage der Azidität der Zellmembranen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1916, XXXIV, S. 648.

[2]) Ch. E. Allen, On the origin and nature of the middle lamella, Bot. Gazette, 1901, XXXII, S. 1.

Mucinen. Mucorarten lösen die Mittellamelle, daher vertritt Schellenberg[1]) die Ansicht, daß sie zum größten Teile aus Hemizellulosen besteht.

Viele Pektine gehen, wie die Entwicklungsgeschichte lehrt, aus der Membran hervor, doch verneint Pfeffer, daß sie sämtlich durch Metamorphose der Zellwand entstehen (Pflanzenphys., 1901, I, S. 476). Tschirch[2]) verlegt ihre Bildung ausschließlich in die Mittellamelle.

Im polarisiertem Lichte tritt die Mittellamelle deutlich hervor; sie zeigt bei gekreuzten Nicols drei scharf getrennte Lamellen, die mittlere erscheint dunkel, die beiden äußeren, den Zellwänden anliegenden, sind hell (Dippel, Lit. S. 51,3). Nach Frey sind Pektinstoffe isotrop. —
Die Mikrochemie der Mittellamelle und ihrer Umwandlungsprodukte ist gegenwärtig noch überwiegend auf Färbungen beschränkt.

Die Pektinfärbungen fallen kräftiger und reiner aus, wenn die Schnitte vorher mit Javellescher Lauge behandelt waren. Sie müssen aber dann in mit Essigsäure angesäuertem Wasser ausgewaschen werden. Vor der Färbung mit Rutheniumrot müssen die Schnitte in schwach ammoniakalischem Wasser abgespült werden.

Verwendet man statt Essigsäure Salzsäure, so tritt bei manchen Schnitten in der Ammoniaklösung Mazeration ein (Kisser)[3]).

Bei der Unterscheidung von Zellulose und Pektin muß die Bildung von Oxyzellulose vermieden werden (Prüfung nach Knagg mit Salzsäure und Benzopurpurin oder nach Schwalbe mit Methylorange und konzentrierten Salzlösungen). Das beste Fixiermittel ist salzsaures Hydroxylamin, mit dem reichlich Hydrozellulose entsteht. Doppelfärbung mit Hydrochloriden von Aminen, die Pektinverbindungen und mit Alkalisalzen von Azodisulfosäuren, die Zellulose färben (Wood)[4]).

Nach v. Fellenberg[5]) besteht im Verhalten gegen basische Farbstoffe ein Unterschied zwischen Pektinsäuren und Pektinen. Erstere werden durch basische Farbstoffe koaguliert, letztere nicht.

Rutheniumrot wird vielfach benutzt (wässerige Lösung, 1 : 5000 bis 10 000, bei Lichtschutz haltbar [es löst sich auch in Alaun- und Chlor-

[1]) H. C. Schellenberg, Untersuchungen über das Verhalten einiger Pilze gegen Hemizellulosen, Flora, 1908, XCVIII, S. 257.

[2]) A. Tschirch, Über Pektin und Protopektin, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1907, XVII, S. 237.

[3]) J. Kisser, Untersuchungen über das Vorkommen und die Verbreitung von Pektinwarzen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1928, LXVIII, S. 206.

[4]) F. M. Wood, Contributions to an investigation of the chemical nature of the cellulose membrane (Ann. of. Bot., 1924, XXXVIII, S. 273).

[5]) Th. v. Fellenberg, Über die Konstitution der Pektinkörper, Biochem. Zeitschr., 1918, LXXXV, S. 375.

kalziumlösung, nicht in Weingeist, Glyzerin, Nelkenöl]). Ein Spezialreagens, das nur Pektine färbt, ist es nicht. Von den Inhaltsstoffen werden stickstoffhaltige Substanzen mitgefärbt. Körnerplasma, Chromatin, Zellkern färben sich (namentlich nach Vorbehandlung mit Alaun, Säurealkohol u. a.), dann Volutin (A. Meyer, S. 680, 3), Glykogen und Isolichenin (Tobler, Lit. S. 312, 3). Mehr ins Gewicht fällt, daß auch weitere Membranen höherer Pflanzen den Farbstoff speichern. Bei Gegenwart von Alkalien werden verholzte Wände mehr oder weniger rötlich gefärbt. Doch bietet Rutheniumrot bei kritischer Benutzung mannigfache Vorteile. Die Färbungen halten sich in Kanadabalsam und in Glyzeringelatine (im Gegensatz zu den übrigen Pektinfärbungen). In der Wirkung schließt es sich den basischen Farbstoffen an, die mit Zellulose und Callose nicht reagieren. Nach Mangin[1]) färben sich die Pektine der Mittellamelle, sowie alle aus den Pektinen hervorgegangenen Körper (Pektinschleime und -gummi), so daß sich die Reaktion bei entwicklungsgeschichtlichen Studien als wertvoll erweist. Als geeignetes Versuchsobjekt empfiehlt Chalon (Lit. S. 911, 1) Kiefernholz (mindestens dreijährig), das zuvor 24 Stunden in Salzsäurealkohol (1 + 3) und ebensolange in Ammoniak gelegen hat.

Der Färbung mit Rutheniumrot läßt Kisser (l. c.) eine sukzessive Behandlung mit verdünnter Salzsäure, Ammoniak und 3proz. Wasserstoffperoxyd (s. S. 906) vorausgehen.

Dem Rutheniumrot schließen sich als Pektinfarbstoffe im Manginschen Sinne[2]) Safranin, Methylenblau, Naphthylenblau R an. Diese Färbungen sind nicht haltbar (nur in 2proz. Borsäure einige Monate, Deckglasumrandung mit Vaselinparaffin). Zarte Schnitte gelangen entweder direkt in die Farblösungen oder sie werden zuvor einige Zeit mit Eau de Javelle behandelt, gut mit Wasser ausgewaschen und sodann mit 1,5proz. Essigsäure neutralisiert. Safranin färbt Pektinsubstanzen orangegelb (Kork und Holz kirschrot), Methylenblau violett (andere Zellbestandteile rein blau). Die Pektinfärbungen verschwinden beim Auswaschen mit schwach verdünnter Essigsäure oder Milchsäure, die übrigen Färbungen bleiben erhalten. Doppelfärbungen erhält man mit Naphthylenblau R und Säuregrün JEEE (in 100 g Wasser je 1 g von den beiden Farbstoffen). Plasma, Kork, Holz grün, Pektine violett. Naphthylenblau kann durch Neutralrot ersetzt werden. Nach Chalon

[1]) L. Mangin, Sur l'emploi du rouge de ruthénium en anatomie végétale, Compt. rend., 1893, CXVI, S. 653.

[2]) L. Mangin, S. l. présence d. composés pectiques d. l. végétaux, Compt. rend., 1889, CIX, 579 und Propriétés et réactions d. comp. pectiques, Journ. de Bot., 1892, VI, S. 206, 235, 363; Bull. Soc. Bot. de France, 1894, XLI, S. 40.

werden Pektine außerdem noch von Hämatoxylin, Magdalarot, Corallin und Kongorot gefärbt.

Daß die angeführten Färbungen den Pektinen zukommen, läßt sich dadurch beweisen, daß aus den Schnitten entweder die Pektinstoffe oder die Zellulosen entfernt werden. Zur Entfernung der Zellulose werden zartere Schnitte 3—4 Tage lang in einem niedrigen, gut verschlossenen Schälchen mit frischem Kupferoxydammoniak mazeriert, die Lösung wird einigemale erneuert. Bei verholzten Geweben muß die Mazeration bis mehrere Wochen dauern. Ist die Zellulose herausgelöst, dann wird die Lösung vorsichtig abgegossen, das Präparatenglas nebst den Präparaten in eine größere Porzellanschale gestellt und mit Wasser aufgefüllt. Die Schnitte lassen sich nun, ohne daß man sie zu berühren braucht, ins Wasser überführen, das einigemale erneuert und schließlich durch 3—5proz. Essigsäure ersetzt wird. In den vorsichtig auf den Objektträger gebrachten Schnitten tritt nach Befeuchten mit Jodlösung weder bei Zusatz von Phosphorsäure noch von Chlorzink die Zellulosereaktion ein; hingegen erhält man die oben genannten Pektinfärbungen. Nach Mangin werden die Pektine durch Kupferoxydammoniak[1]) in Pektinsäure übergeführt, die sich in Ammonoxalat und in verdünntem Ammoniak vollständig auflöst. Zum Gegenbeweis lassen sich die Pektine entfernen, so daß nur die Zelluloseanteile in den Schnitten zurückbleiben. Zu diesem Nachweise werden die Schnitte in 2proz. Salzsäure ½ Stunde lang gekocht, gut mit Wasser ausgewaschen, dann in 2proz. Kalilauge oder Ammoniak gekocht und nochmals gründlich ausgewaschen. Es ist empfehlenswert, die ganze Prozedur in einer Porzellanschale vorzunehmen, so daß ein Übertragen der Schnitte mit Nadeln fortfällt, aus Reagensgläsern lassen sich die Schnitte nicht so leicht entfernen. Die zurückbleibenden Wände geben jetzt Zellulosereaktionen, färben sich aber nicht mit Pektinfarbstoffen.

Auch dadurch, daß man in Glyzerin auf 200—300° erhitzt, kann man das Pektin entfernen (van Wisselingh). Über ein weiteres Verfahren s. S. 906.

Das Pektin der Mittellamelle soll pektinsaurer Kalk sein, weil, wie Mangin meint, zur Lösung Salzsäure nötig sei. Zur Isolierung der Zellen werden kleine Gewebestücke in Salzsäurealkohol (1 konzentrierte Salzsäure + 3 Alkohol) mazeriert. Dadurch wird die Pektinsäure in Freiheit gesetzt. Die überschüssige Salzsäure und das gebildete Chlorkalzium werden mit Wasser entfernt. Die Pektinsäure ist unlöslich in

---

[1]) Nach Kabsch sollte Kupferoxydammoniak ein Reagens auf Pektose sein, die dadurch in pektinsaures Kupfer übergeführt würde, Jahrb. f. wiss. Bot., 1863, III, S. 357.

Wasser und bleibt im Gewebe, die Zellen noch zusammenhaltend. Erst bei Zusatz von verdünnter Kalilauge, Natronlauge, Ammoniak oder von schwachen Lösungen von Alkalikarbonaten oder -phosphaten erfolgt Lösung der Pektinsäure und die einzelnen Zellen werden durch leichten Druck isoliert. Für die Anwesenheit von Pektinsäuren spricht ferner der Befund, daß die mit Salzsäurealkohol behandelten, gut ausgewaschenen Schnitte nicht zerfallen, wenn man sie in Kalk- oder Barytwasser taucht, da alsdann unlösliche pektinsaure Kalk- oder Barytsalze entstehen, die die Zellen von neuem zusammenkitten[1]). Will man die Pektinsäure zur Anschauung bringen, dann muß man die mit Salzsäurealkohol mazerierten Schnitte nach dem Auswaschen mit Wasser färben (Phenosafranin, Methylenblau). Die Pektinsäure erscheint stark gefärbt zwischen den Zellen als dünne Lamelle, während sie an den Interzellularen punkt- und knopfförmige, regellos angeordnete Verdickungen bildet (Blätter von Iris, Helleborus niger, Yucca).

Wille[2]) tritt ebenfalls für Kalkpektat ein, da die Mittellamelle der Laminarien sich nach Vorbehandlung mit verdünnter Salzsäure in Natriumkarbonat auflöst. Bekannt ist das Auftreten von Kalzium in der Mittellamelle, doch fehlt der Beweis, daß das Kalzium an Pektinsäure gebunden ist, daß überhaupt Pektinsäure vorliegt. Gegen Pektinsäure sprechen die Erfahrungen bei der Mazeration (mit Ammoniak und anderen Alkalien, S. 50). Zudem soll sich nach Devaux[3]) die Mittellamelle nach Behandlung mit weingeistiger Salzsäure (1 Salzsäure, 4 Weingeist) allein lösen. Die Schnitte werden 20 Minuten mit der Säure mazeriert, dann aufgekocht (5—10 Minuten, die Zeit ist bei den verschiedenen Pflanzen erst auszuprobieren), mit Alkohol abgewaschen und in Wasser gelegt. Lösung dürfte, wenn ein Kalziumpektat vorläge, nicht eintreten, denn durch die Salzsäure würde das Kalziumpektat in Chlorkalzium und Pektinsäure zerlegt werden und die Pektinsäure ist in Wasser fast unlöslich. Devaux findet ferner, daß Schnitte, die mit weingeistiger Salzsäure behandelt waren, vor dem Zerfall durch Eintragen in Alkalien bewahrt werden.

Die Fähigkeit der Membran Metalle zu speichern kommt nach Devaux[4]) den Pektinen zu. Die Schnitte kommen auf einige Augen-

---

[1]) L. Mangin, Substance intercell., Compt. rend., 1890, CX, S. 295.

[2]) N. Wille, Physiol. Anat. d. Laminar., Christiania 1897.

[3]) H. Devaux, Structure de la lamelle moyenne dans les tissus mous, Mém. Soc. de Bordeaux, 1903, III, S. 89.

[4]) M. Devaux, Sur les réactifs colorants des substances pectiques. — Sur la coloration des composés pectiques, Procès-verb. de la Soc. Linnéenne de Bordeaux 1901.

blicke in Eisensulfat und werden mit destilliertem, dann mit durch Essigsäure schwach angesäuertem Wasser ausgewaschen; sie färben sich nach Einwirkung von Ferrocyankalium blau. Die Blaufärbung, die sich durch Salzsäure verstärken läßt, hält sich in Gelatine und in Kanadabalsam. Zarte Membranen färben sich am stärksten. Schnitte, aus denen die Pektine zuvor entfernt wurden, färben sich nicht, Holzmembranen bleiben nach Vorbehandlung mit stark verdünnten Säuren farblos.

Die Zugehörigkeit der Pektine zu den tierischen Mucinen, die Schroeder[1]) mit den Angaben von Ishii[2]) begründet, kommt schon wegen des N-Gehalts der Mucine nicht in Frage. Wenn einige Pektine die Biuret-, Xanthoprotein- und Millonsche Reaktion gaben, so enthielten sie offenbar Eiweiß.

Die **Pektine der Früchte,** die zur Auflockerung der Gewebe, zur Isolierung der Samen dienen, sind nach Tschirch und Mitarbeitern ausschließlich Produkte der Mittellamelle und lösen sich in konzentrierter Rohrzuckerlösung. Zuckerlösung läßt sich somit zur Unterscheidung der unveränderten Mittellamelle von der in Pektinmetamorphose begriffenen benutzen. Mangin[3]) gebrauchte 1893 Zuckerlösung, um gehärtete Pektinschleime zur schnelleren Quellung und Lösung zu bringen. Rosenberg[4]) benutzte bei einigen Früchten 35—65proz. Rohrzuckerlösungen, in welchen er die Schnitte frischen Materials aufkochte und zwar nicht unter Deckglas, sondern „es ist Bedingung, die Präparate mit einer großen Menge Zuckerlösung längere Zeit im Reagenzglase zu kochen“. Die Versuche sind nicht einwandfrei. Bei den Pektinen der Umbelliferenwurzeln hat Tunmann[5]) folgenden Weg eingeschlagen: Behandlung der Schnitte mit Methylenblau-Zuckerlösung in der Kälte und Feststellung der Quellung. Auch hiergegen lassen sich Einwände erheben; daher wurde stets „ein Vergleichspräparat vor der Behandlung mit Zuckerlösung erst mit Bleiazetat gehärtet“. Bei der Nachprüfung hielten diese Angaben einer Kritik nicht stand. Kocht man nämlich Schnitte (Pirus malus, Ribes rubrum u. a.) mit Wasser allein, so erhält man die gleichen Bilder wie mit Zuckerlösung. Wie es scheint, erfolgt die Lösung nicht durch das Wasser allein, sondern durch die im

[1]) B. Schroeder, Chem. Verwandtschaft der tierischen Mucine mit den pflanzlichen Pektinen, Bot. Centralbl., Beih., 1901, X, S. 122.

[2]) Ishii, Imp. Un. Coll. Agric. Bull., 1894, II, S. 97. Mucin wird auch für die Aleuronkörner von Fraxinus angegeben (Lit. S. 815, 3).

[3]) L. Mangin, Bull. d. l. soc. bot. de France, 1893, XL, S. 119.

[4]) E. Rosenberg, Über die Pektinmetamorphose, Berner Diss., 1908, S. 23.

[5]) O. Tunmann, Bildung der Luftlücken bei Wurzeln der Umbelliferen, Pharm. Zentralh., 1907, XLVIII, S. 885.

Gewebe befindlichen Säuren, an denen gerade Früchte bekanntlich sehr reich sind. Der Makrochemie zufolge sind übrigens viele Fruchtpektine mehr oder weniger leicht und vollständig in Wasser löslich. Ohne den Wert der Zuckerreaktion in Frage zu stellen, erscheint es doch unbedingt erforderlich, die Pektine in den Schnitten zu härten und die gehärteten Schnitte von den Säuren durch Wässern zu befreien und zwar vor der Zuckerreaktion, die unter Deckglas unter ständiger mikroskopischer Kontrolle auszuführen ist. Hällström (Lit. S. 391, 3) hat die Pektinmembranen von Tamarindus indica (reife Frucht) mit Zuckerlösung nicht zur Lösung bringen können. — Um die Pektinbildung entwicklungsgeschichtlich zu verfolgen, wird man bei Früchten verschiedene Reifestadien konservieren müssen; in Betracht kommen Weingeistdampf, verdünnter Weingeist, 1—3proz. Formol (aber nicht 0,1proz. [Rosenberg], in dem Früchte bald faulen); systematische Untersuchungen hierüber liegen nicht vor.

Färbungen führen bei der Unterscheidung der unveränderten und der in Pektinmetamorphose begriffenen Mittellamelle nicht zum Ziel, da beide mit gleicher Stärke Farbstoffe speichern. Die Pektine der Früchte färben sich ebenfalls mit allen Pektinfarbstoffen. Einen Fall, bei dem die Pektinbildung aus der Mittellamelle ohne weiteres aus der mikroskopischen Betrachtung hervorgeht (Verdickung und Verquellung) haben Tschirch und Oesterle (Anat. Atlas, S. 45) bei Sambucus nigra gefunden. Im allgemeinen bleibt aber nach Tunmanns Befunden die Mittellamelle (P. malus, P. cydonia) bis zur Auflösung ungemein zart. Ähnliche Ergebnisse erhielt Jähkel (S. 39 der S. 924, 1 ang. Diss.) bei Banane und Mispel: „da alle Zellen in den reifen Früchten locker nebeneinander liegen, läßt sich vermuten, daß die Mittellamellen der einzelnen Zellen irgendwie aufgelöst werden. Die Zellwände sind aber so dünn, daß eine Mittellamelle auch in unreifen Früchten nicht sicher zu erkennen ist. Als Färbemittel wurden Methylenblau und Rutheniumrot benutzt. Sowohl in harten wie in weichen Früchten färbten sich die Zellwände völlig gleichmäßig. In reifen weichen Früchten erscheinen höchstens die Wände nach innen (!) minder scharf begrenzt als bei unreifen".

Der Trichomdeckel der Saugschuppen der Tillandsien besteht aus einem Zellulosegerüst mit reichlichen Pektinmassen, die nach Mez (Phys. Bromeliaceen-Stud., Jahrb. f. wiss. Bot., 1904, XL, S. 157) die Quellung bewirken. Chlorzinkjod färbt den Deckel, der sich nicht in Kupferoxydammoniak löst, schwach gelblich, Phloroglucinsalzsäure grünlichgelb; auch Rutheniumrot und Methylenblau färben ihn intensiv. Nach Vorbehandlung mit 5proz. Salzsäure und Kalilauge ruft Chlorzinkjod violette Färbung hervor.

Über Pektinschleime s. Schleime.

Lukaszewicz[1]) versucht Pektinkörner im Kopf- und Halsteil der Brennhaare von Urtica dioica L. dadurch nachzuweisen, daß er auf dem Platinblech verascht und die Asche mit Schwefelsäure behandelt. An den Stellen, wo die Pektinkörner lagen, bilden sich, vom Kalziumkarbonat der Asche der Pektinkörner herrührend, Kohlendioxydblasen; das Lumen der Haare füllt sich mit Gipsnadeln.

Es ist klar, daß ein solcher indirekter Nachweis nur mit Vorsicht beurteilt werden kann.

Die sogenannte resinogene Schicht[2])

Art und Ort der Bildung der Sekrete, insbesondere der ätherischen Öle und Harze sind lange und viel umstritten gewesen. Die Entscheidung darüber, insbesondere über die Frage, ob die Sekretbehälter oder die benachbarten Zellen das Harz erzeugen, hängt nicht zuletzt von der Beantwortung der Frage ab, ob die den Sekretbehälter von den benachbarten Zellen trennenden Membranen für die Sekrete durchlässig sind oder nicht. Während N. J. C. Müller der Anschauung war, daß die Sekrete sich im Innern der Zellen bilden und durch die Membranen der sezernierenden Zellen hindurch in den Sekretraum gelangen, ging A. Tschirch von dem Satze aus „Es erscheint nicht wahrscheinlich, daß Harz und ätherisches Öl durch mit Wasser imbibierte Membranen diffundieren kann". Als logische Folgerung ergibt sich die Lehre von der resinogenen Schicht, die Tschirch zunächst an den Sekretbehältern von Umbelliferen und Coniferen zu sehen glaubte. Er fand in den sezernierenden Zellen kein Sekret. Über die Ermittlung der resinogenen Schicht macht er selbst folgende Angaben. Löst man (aus den jungen schizogenen Sekretbehältern) das Harz mittels Alkohol heraus, so bleibt noch ein kleiner Rückstand im Behälter zurück, der auf Wasserzusatz quillt und durch Alkohol sich kontrahiert, also den Charakter einer Schleimsubstanz besitzt. Sind die Kanäle nicht gar zu jung, so kann man an kontrahierten Präparaten deutlich feststellen, daß die Schleimsubstanz der gegen den Kanal gerichteten Wand der Sezernierungszellen aufgelagert und gegen den Kanal hin durch eine scharfe Linie abgegrenzt ist. Ganz junge Kanäle erfüllt jedoch die Masse scheinbar vollständig. Ferner sagt er von der in einem späteren Studium in der Mitte des Kanals befindlichen Höhle: „Dieselbe führt meist Harzbalsam, ganz besonders aber ist der nunmehr ziemlich stark herangewachsene Schleimbelag der sezernierenden Zellen reichlich mit Harz durchtränkt. In ihm sehe ich die ‚resinogene Schicht', das Laboratorium der Harzerzeugung"[3]).

Tschirch und Bécheraz[4]) studierten die Schicht der schizogenen Gänge. Das Material wurde allmählich bis auf 100° im Trockenschranke getrocknet. Aus dem Trockenmaterial wurden Schnitte her-

---

[1]) Lukaszewicz, Acta soc. Botan. Polon., 1923, I, Nr. 23, nach Fortschritte der Mikrochemie (1928), S. 292.

[2]) Über die ältere Literatur s. A. Tschirch, Die Harze und die Harzbehälter (Leipzig 1900), Bd. II.

[3]) L. c. S. 359.

[4]) A. Bécheraz, Sekretbildung in den schizogenen Gängen, Diss. Bern, 1893, S. 16.

gestellt und das harzige Sekret durch Alkohol steigender Konzentration gelöst. Die „resinogene“ Schicht tritt dann nach ihren Angaben hervor, ihr sind Körnchen aufgelagert; sie ist nach innen von einer Haut („innere Haut“) abgegrenzt. Die Schicht wird mit Jodreagentien und Ferrichlorid gelb, quillt in Kalilauge, reagiert nicht mit Millon, löst sich nicht in Schwefelsäure und in Salzsäure, ist aber beim Erwärmen in Kaliumchlorat-Salpetersäure löslich, wobei „Körnchen und Leisten“ unverändert zurückbleiben. Farbenreaktionen wurden nicht erhalten. Der inneren Haut und der Schicht muß „jedenfalls die reine Zellulosenatur abgesprochen werden“. Später erhielt Tunmann[1]) aber Färbungen und zwar nur mit Pektinfarbstoffen, wodurch nach seiner Ansicht im Verein mit den Jodreaktionen die chemischen Beziehungen der Schicht der Gänge mit der Mittellamelle sichergestellt wurden. Gute Färbungen gaben Rutheniumrot sowie Bismarckbraun, Naphthylenblau, Safranin und Methylenblau in konzentrierter Rohrzuckerlösung. Die Färbungen mit den Rohrzuckerlösungen konnten Rosenthaler und Stadler[2]) bestätigen.

Fig. 179. Labiatendrüsen, Trockenmaterial mit alkohol. Chloralhydrat behandelt. Der Schleim (*rsg.* = resinog. Schicht) hat sich in Netzstruktur (Kunstprodukt) ausgeschieden (Tunmann)

Tschirch will ferner die resinogene Schicht bei Mentha „in Gestalt eines der Kutikula anliegenden Netzes“ beobachtet haben (Anat. Atlas S. 74) und Mitlacher (Ztschr. öst. Ap. Ver., 1908, LII, Nr. 1) fand sie derart bei getrocknetem Material nach vorsichtiger Behandlung mit Alkohol (unter Deckglas). Auch durch weingeistiges Chloralhydrat läßt sich die Schicht in dieser Form, die Tunmann (Lit. S. 44, 4) als Vakuolentyp bezeichnete, sichtbar machen (Fig. 179). Die im folgenden mitgeteilten Nachprüfungen zeigen aber, daß diese Vakuolenform ein Kunstprodukt ist und in Parallele gestellt werden muß mit jenen Schaumstrukturen, die Longo bei Schleimen (s. d.), Boresch bei Gummi (s. d.), Molisch bei Milchsäften beobachteten, und mit den „künstlichen Zellen“, die Beijerinck (Zentrbl. Bakt., 1896, II, S. 697)

---

[1]) O. Tunmann, Über die resinogenen Schichten der Sekretbildung der Umbelliferen, Ber. deutsch. pharm. Ges., 1907, XVII, S. 456.

[2]) L. Rosenthaler und P. Stadler, Ein Beitrag zur Anatomie von Cnicus benedictus L., Arch. d. Pharm., 1908, CCXLVI, S. 462.

aus Gelatine und löslicher Stärke erhalten hat. Bei den gleichen Gegenständen erhalten wir statt der Schaumstruktur die Schicht in „membranartiger Form“ auf folgende Weise: Wir schneiden mit der Schere vom Blattrande oder vom Nerven einen feinen Streifen ab und wählen eine Drüse, deren Sekret ausgetreten, breitgelaufen und mehr oder weniger eingetrocknet ist. Das Öl wird vorsichtig herausgelöst, wozu sich bei harzigen und fetthaltigen Sekreten auch Ammoniak eignet (Fig. 180). Nach dem Lösen der Öle und Harze zeigt sich eine Haut, die die gleiche Ausdehnung und die gleichen Umrisse besitzt, wie die ausgetretene Sekretmasse. Zuweilen ist eine Streifung sichtbar, ebenfalls

[illegible]
abs. Alkohol), Salvia glutinosa (rechts, Ammoniak, Alkohol, Äther) (Tunmann)

ein Kunstprodukt (Fig. 180). Bei künstlich entleerten Drüsen treten die Erscheinungen auch, doch nicht so gut, hervor.

Tunmann nahm daher an, daß der Schleim in den lebenden Sekretbehältern in flüssiger Form vorliegt und mit den Balsamanteilen des Sekretes eine Emulsion bildet. Nur dann, wenn die Schleimproduktion größer wird oder die Balsambildung übertrifft (schizogene Gänge, Umbelliferen, Kolleteren), sei der Schleim als Schicht vorhanden. Balsam- und Schleimbildung sind aber in der gleichen Pflanze im Laufe der Entwicklung nicht konstant. Am Ende der Vegetationsperiode überwiegt oft die Schleimproduktion. Außerdem zeigt der „resinogene“ Schleim nicht in allen Stadien der Vegetation die gleiche Zusammensetzung. Bei Kompositen, Umbelliferen, Kolleteren und Drüsenflächen wird er in jugendlichen Organen nach Reinigung mit Alkalien durch Jodreagentien blau, seltener blauviolett; wahrscheinlich gehen Zellulose-

anteile später in Pektine über. Bei Labiaten erhielt Tunmann nur Pektinreaktionen.

Bei den Umbelliferen sind die Gänge vielfach durch Membranen ausgekleidet, welche sich erst im Laufe der Vegetation bilden und zuweilen auch gefächert[1]). Diese **Auskleidungen** betrachtet Tschirch (Harze, S. 1129) als Reste der resinogenen Schicht, während A. Meyer (Lit S. 336, 4) sie zu den „amorphen" Membranen rechnet. Sie sind unlöslich in Schwefelsäure, Chromsäure, Kalilauge, Eisessig, Chloroform, Terpentinöl. Durch Salpetersäure und Kaliumchlorat werden sie gebleicht, sie lassen sich frei präparieren, wenn man die mit Ammoniak gekochten Früchte bis zum Zerfall der Perikarpien mit Kaliumchloratsalpetersäure erhitzt. van Wisselingh[2]) nannte die Substanz Vittin, ließ aber später diesen Namen wieder fallen. Die Vittinlamellen sollen keine Zellulose führen; sie werden von verdünnter Chromsäure gelöst und geben die Cerinreaktion (s. Kork). Sie enthalten vielleicht Pektinsubstanzen, da sie sich nach Vorbehandlung mit verdünnter Chromsäure mit angesäuerter Methylenblaulösung und mit Rutheniumrot färben. Außerdem soll aber, besonders in den mittleren Partien der Querwände, noch eine in Kalilauge leicht lösliche Substanz auftreten, die die Cerinreaktion nicht gibt. — Bei Astrantia major bestehen die Auskleidungen aus einer korkartigen Lamelle, die jedoch keine Phellonsäurereaktion zeigt, sowie aus einer verholzten Lamelle.

Die Tschirchsche Lehre von der resinogenen Schicht hat Anerkennung fast nur bei den unter seinem direkten Einfluß Stehenden gefunden, zumal R. H. Schmidt[3]) und A. Heller[4]) bald bewiesen, daß Tschirchs Grundannahme, Harz und ätherisches Öl könnten nicht durch mit Wasser imbibierte Membranen diffundieren, nicht richtig ist.

Dafür, daß Öl durch die Zellhaut treten kann, trat auch Pfeffer in seiner Pflanzenphysiologie ein, „das fein zerteilte Öl kann sehr wohl ungelöst die Zellhaut passieren und durch die Plasmahaut können sogar Öltropfen und feste Körper von meßbarem Durchmesser schon bei geringem mechanischem Druck hindurchgetrieben werden."

---

[1]) Auskleidungen und Querwände finden sich auch in den vegetativen Teilen der Umbelliferen; die Bildung ist eine Alterserscheinung (Tunmann, Lit. S. 326, 1), bei Ferula sind die Querwände sicher Ausscheidungen des Sekretes.

[2]) C. van Wisselingh, S. les bandelettes d. Ombellif., Arch. Néerl., 1895, XXIX, S. 199.

[3]) R. H. Schmidt, Über Aufnahme und Verarbeitung von fetten Ölen durch Pflanzen, Flora, 1891, S. 300ff.

[4]) A. Heller, Über die Wirkung ätherischer Öle und einiger verwandter Körper auf die Pflanzen, Flora, 1904, S. 1ff.

E. Schwabach[1]) gelang es dann, fettes Öl in die Zellen von Kiefernholz, ätherisches in die Zellen des Wassergewebes eines Peperomia-Blattes zu drücken.

E. Schwabach konnte außerdem nach Färbung mit Kupferazetat mit Sicherheit gefärbten Balsam auch in den Epithelzellen der Harzgänge von Koniferennadeln nachweisen.

Über die Entstehung des ätherischen Öles in den Ölzellen von Aristolochia brasiliensis gibt R. Müller[2]) an, daß es aus dem Plasma zunächst in eine Anzahl kleinerer Vakuolen abgesondert wird. Von einer Verschleimung der Wand der Sekretzellen ist weder in den jüngsten noch in älteren Entwicklungsstadien irgendetwas zu sehen. Weder die Befunde an den ausgebildeten Ölzellen noch die entwicklungsgeschichtlichen Tatsachen lassen auch nur einen Punkt erkennen, der mit der Tschirchschen Theorie übereinstimmen würde.

Viele Jahre später hat dann Hannig[3]) das Studium dieser Frage wieder aufgenommen. Er verwendete eine Lösung von 1 % Chromsäure in gesättigtem Kupferazetat und erzielte dadurch gleichzeitig Färbung und Härtung. Der Inhalt der Koniferennadeln, die in das Hannigsche Reagens gebracht waren, wurde nach 5—6 Tagen bröckelig, bei längerer Einwirkung glasartig. Bei Gegenständen, die lange liegen bleiben sollen, muß das Fixiermittel nach einigen Monaten oder nach Beendigung der Fixierung ausgewaschen und durch eine Kupferazetatlösung ersetzt werden, da das Hannigsche Reagens sich mit der Zeit zersetzt und bei monatelanger Einwirkung die Harzmassen verändert. Hannig konnte feststellen, daß in den Epithelzellen der Harzgänge der Koniferennadeln Sekrettröpfchen enthalten sind, die mikrochemisch mit dem Balsam der Harzkanäle übereinstimmen und zwar treten die Sekrettröpfchen normalerweise nur auf der an den Harzkanal grenzenden Oberfläche des Protoplasten (Sekretfeld), nicht im Innern desselben auf. Eine resinogene Schicht fand Hannig nicht. Er beobachtete vielmehr, daß der ganze Harzkanal erwachsener Nadeln von einer homogenen wasserklaren, schleimfreien Flüssigkeit bis zu den scharf erkennbaren Konturen der Epithelzellen erfüllt ist. Auch in den jüngsten Entwicklungsstadien konnte entgegen den Angaben Tschirchs kein Schleim in den Harzkanälen festgestellt werden.

Zu denselben Ergebnissen wie Hannig kam Franck[4]) bei allen

---

[1]) E. Schwabach, Bemerkungen zu den Angaben von A. Tschirch über die Harzabscheidungen in Koniferennadeln, Ber. deutsch. bot. Ges., 1900, XVIII, S. 417.

[2]) R. Müller, Zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Ölbehälter, Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XXIII, S. 292.

[3]) E. Hannig, Untersuchungen über die Harzbildung in Koniferennadeln, Zeitschr. f. Bot., 1922, XIV, S. 385.

[4]) A. Franck, Über die Harzbildung in Holz und Rinde der Koniferen, Bot. Arch., 1923, III, S. 173.

von ihr untersuchten Koniferen. Sie fixierte außer mit der Hannigschen Lösung mit Kaliumdichromat und färbte mit Sudan und Alkannatinktur (die Alkannafärbung war meist erst nach 24 Stunden ausreichend). Moenikes[1]) fand bei allen Harzgängen der Kompositen und Araliaceen und bei der Mehrzahl der Umbelliferen keinen Schleim und in keinem Fall eine resinogene Schicht. Das Sekret wird im Innern der Epithelzellen in Tröpfchenform ausgeschieden.

Ebensowenig wie bei den Harzgängen haben neuere Untersucher eine resinogene Schicht bei den Öldrüsen und Ölzellen gefunden. Selbst Dormann[2]), der die Tschirchsche Lehre wegen den Untersuchungen Hansteen-Cranners über die Zusammensetzung der Membran (s. S. 890) für möglich hält, stellt doch das Bestehen einer resinogenen Schicht im Tschirchschen Sinn in Abrede. Lehmann[3]) fand nichts desgleichen bei den von ihm untersuchten Ölzellen der Lauraceen, Magnoliaceen und Aristolochiaceen. Ein Gegner der Tschirchschen Theorie ist auch Stshsepkina (vgl. S. 340, 2).

Auch Klug[4]) konnte bei den Sekretdrüsen der Labiaten und Kompositen nichts beobachten, was der Tschirchschen resinogenen Schicht entsprochen hätte.

Von Guttenberg[5]) kommt für das Harz der Harzdrüsen von Lysimachia vulgaris zu der Ansicht, daß das Plasma das Harz bildet und es erst in der Lücke und in der Membran und schließlich, wenn dort kein Platz mehr ist, auch zwischen seine eigenen Teile ablagert.

Fehér[6]) konnte bei den sezernierenden Hautdrüsen von Populus pyramidalis und balsamifera trotz vielfacher Wiederholung seiner Untersuchungen weder Schleim noch eine resinogene Schicht finden.

A. Leemann fand, daß die Sekretzellen von Cinnamomum cam-

---

[1]) A. Moenikes, Zur Frage der Harzbildung bei den Umbelliferen-, Kompositen- und Araliaceenwurzeln, Bot. Arch., 1924, IV, S. 91.

[2]) F. Dormann, Zur Kenntnis der Hautdrüsen und der Harzsekretion von Alnus viridis, Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien. Math. naturw. Kl., Abt. 1, 1924, CXXXIII, S. 585.

[3]) C. Lehmann, Studien über den Bau und die Entwicklungsgeschichte von Ölzellen.

[4]) J. Klug, Über die Sekretdrüsen bei den Labiaten und Kompositen, Inaug.-Diss., Frankfurt a. M. 1926.

[5]) H. v. Guttenberg, Die Harzdrüsen von Lysimachia vulgaris L., Planta, 1928, V, S. 232.

[6]) D. Fehér, Über die Abscheidung von Harzbalsam auf den jungen Trieben unserer einheimischen Populus-Arten, Beih. z. Bot. Centralbl., 1922, XXXIX, S. 81.

phora und Asarum europaeum in keinem Stadium ihrer Entwicklung Schleim oder eine resinogene Schicht aufweisen. Das ätherische Öl entsteht in diesen Fällen vielmehr im Plasma. Die Abwesenheit von Schleim stellt Leemann[1]) auf folgende Weise fest. Er bringt die durch frisches Material angefertigten Schnitte sehr rasch unter das Mikroskop und fügt Weingeist unter das Deckglas hinzu. Man kann dann beobachten, wie sich das Plasma unter dem Einfluß des Weingeists zusammenzieht, ohne daß Schleim zu bemerken ist.

Besonders eingehend setzt sich Elias[2]), der die Sekretbehälter von Umbelliferen und Rutaceen untersuchte, mit der Tschirchschen Theorie auseinander. Er bereitete ältere Wurzeln von Umbelliferen so zur Untersuchung vor, daß er sie unter eine Glasglocke brachte und diese 7—10 Stunden mit der Wasserstrahlpumpe evakuierte, bis die Wurzeln sich noch ein wenig biegen ließen.

Junge Keimlinge kommen auf je 5—8 Minuten in Weingeist steigender Konzentration (20, 40, 50, 70, 80- und 90proz.) dann 30 Minuten in absoluten Alkohol. Oft genügte einstündige Fixierung in 50proz. Weingeist. Die Untersuchung der Schnitte erfolgte in 40proz. Weingeist. Die verhältnismäßig starken Wurzeln kamen, nachdem sie drei Monate in der Hannigschen Lösung gelegen waren, für je zwei Stunden in die steigende Weingeistreihe und einen Tag in absoluten Alkohol. Zur Färbung derart gehärteten Materials müssen die Farblösungen 3 bis 4 Stunden einwirken. Zum Färben der Membranen wurde Rutheniumrot verwendet, zu der der Sekrete u. a. Osmiumsäure unter Kontrolle durch die Verseifungsreaktion (bei negativem Ausfall Abwesenheit von Fetten). Bei Radix angelicae und Radix levistici wurde zur Färbung eine 3proz. Lösung von Jodgrün verwendet, die das Sekret blau, die Schleimschicht hellgrün färbt. Die bei der Untersuchung der Umbelliferenwurzeln störende Stärke wurde durch Einwirkung von Diastase entfernt.

Für die Feststellung des Sitzes der Öltröpfchen wurde Plasmolyse durch eine 10- bis 15proz. mit Anilinblau schwach gefärbte Lösung von Kalisalpeter verwendet.

---

[1]) A. Leemann, Contribution á l'étude de l'Asarum europaeum L. avec une étude particulière sur le développement des cellules sécrétrices, Diss. Genf 1927; derselbe, La théorie de Tschirch et le développement des cellules sécrétrices, Compt. rend. des séances de la société de physique et d'histoire naturelle de Genève, 1926, S. 88.

[2]) S. Elias, Die Entwicklung der Sekretbehälter usw., Inaug. Diss. Berlin 1929. — E. Gilg und P. N. Schürhoff, Die Entwicklung der Sekretbehälter bei den Umbelliferen und Rutaceen, Arch. d. Pharm., 1930, CCLXVIII, S. 7.

Für die Untersuchung der Rutaceen empfiehlt Elias eine Behandlung mit Javellescher Lauge[1]) in folgender Weise:

Handschnitte werden 5—10 Minuten, je nach dem Grade der Einwirkung, Mikrotomschnitte 10—20 Minuten in der Javelleschen Lauge belassen. Nach zweimaligem Auswaschen überträgt man die Schnitte für 1—2 Minuten in 1proz. Essigsäure, wäscht wieder aus und färbt mit Rutheniumrot, Hämatoxylin u. dgl. Nach dem Färben und Auswaschen bringt man die Schnitte, besonders die Mikrotomschnitte am besten in 1proz. Essigsäure und dann in ganz schwache Ammoniaklösung, um die durch die Essigsäure verschwundene Färbung wieder herzustellen. Nach abermaligem Auswaschen mit destilliertem Wasser wird das Präparat in das einschließende Medium gebracht.

Für Untersuchungen auf dem Gebiete, von dem dieser Abschnitt handelt, kann das Arbeiten mit dem Gefriermikrotom sehr nützlich sein.

Das Ergebnis der Eliasschen Untersuchung ist das folgende:

Die Sekretbehälter der Umbelliferen enthalten als Auskleidung eine Schleimschicht, die durch Verschleimung der äußersten Membran der den Kanal umgebenden Zellen entstanden ist. Diese Schleimschicht ist keine resinogene Schicht im Sinne Tschirchs. Sie ist zu den Pektinschleimen zu rechnen und ist von feinen Zellulosefäden durchsetzt. Das Sekret wird in der Epithelzelle erzeugt und gelangt durch die Zellwand in das Innere des Behälters. Allein dem Protoplasma ist die Fähigkeit der Sekretbildung zuzuschreiben. Auch das Sekret der Ölbehälter der Rutaceen entsteht im Plasma. Durch Verschleimung der Zellmembranen und aus den in Auflösung begriffenen Wänden wird eine pektinstoffhaltige Wandauskleidung gebildet, die mit der von Tschirch aufgefundenen Schicht nur den schleimigen Charakter gemeinsam hat. Die Bezeichnung „resinogene Schicht“ ist also auch hier unzutreffend. Eigene Untersuchungen an mit Juelscher Flüssigkeit fixierten Umbelliferenfrüchten (Anis, Fenchel), deren Mikrotomschnitte mit Hämatoxylin und Kongocorinth gefärbt wurden, ließen keine Anzeichen einer resinogenen Schicht erkennen.

Aus allen diesen Angaben geht ohne Zweifel hervor, daß kein einziger von den neueren Beobachtern die resinogene Schicht gesehen hat und daß die Sekrete ein Erzeugnis des Plasmas sind.

---

[1]) Die Javellesche Flüssigkeit wird am besten selbst hergestellt und darf nicht länger als sechs Tage alt sein. Sie darf nicht allzulange einwirken, da sich sonst Kristalle bilden, die die Untersuchung erschweren. Haben sie sich gebildet, so behandelt man die Schnitte kurz mit ungefähr 1proz. Essigsäure und wäscht nachher gut aus.

Die Tschirchsche Lehre von der resinogenen Schicht ist eine von falschen Voraussetzungen ausgehende und auf fehlerhafte Beobachtungen[1]) gestützte Irrlehre[2]).

Phytomelane

Phytomelane sind amorphe, schwarze, stickstofffreie Stoffe, deren Wasserstoff und Sauerstoff in annähernd gleichem Verhältnis wie bei den Kohlenhydraten zugegen ist, deren Kohlenstoffgehalt (67—76 %) ungemein hoch ist. Kompositenfrüchte führen 0,7 (Zinnia elegans) bis 6,9 % (Carthamus tinctorius) Phytomelane. Sie werden durch mehrtägige Mazeration der Pflanzenteile mit Chrom-Schwefelsäure gewonnen, der Rückstand besteht aus Phytomelanen[3]). In den Früchten bilden sie möglicherweise einen Schutz gegen Austrocknung, tierische Feinde u. a. Hanausek hat auf die Wechselbeziehungen zwischen Phytomelanen und Sekreten oder Oxalaten hingewiesen. Wo Phytomelane auftreten, fehlen Sekrete und kommen nur wenig Oxalate vor.

In Wurzeln (Perezia) fanden sie Th. Greenish (Pharm. Journ., 1884) und C. Hartwich (Chem. Ztg., 1885, IX, 1298), der ihre große Widerstandsstandsfähigkeit gegen Reagentien erkannte; H. Kraemer und M. Sollenberger beschreiben sie in Echinacea angust. (Am. Drugg. a. Pharm. Rec., 1911, 23). Nach H. Solereder kommen sie (nach F. Ebert, Beitr. z. Kenntn. d. chin. Arzneisch., Diss. Zürich 1907, 97) „in den vegetativen Teilen der Tubulifloren nicht selten vor". In Früchten, in denen sie sich zur Reife hin stark vermehren, so daß die reifen Achänen braunschwarz aussehen, wurden sie gefunden von: C. O. Harz (Samenkunde, 1885, II, 851) in Helianthus, R. Pfister (Ölliefernd. Kompositenfr., Landw. Versuchsst., 1894, XLIII) in Carthamus, Tschirch und Oesterle (Atlas, 1900, 273) in Arnica, T. F. Hanausek in Helianthus annuus (Ber. d. bot. Ges., 1902, XX, 449), C. L. Gerdts (Bau u. Entw. d. Kompositenfr., Diss. Bern 1905, 55) in Rudbeckia und Coreopsis und Ebert in Xanthium (Carthamus) und Silybum.

In der Alantwurzel wurde Phytomelan etwa gleichzeitig von Hanausek[4]) und Griebel[5]) gefunden.

---

[1]) „Ich kann den unangenehmen Eindruck nicht auslöschen, den die Zeichnungen von Tschirch und seinen Schülern auf mich machen. Die Entwicklung der Sekretzellen — entspricht in keiner Weise den Tschirchschen Vorstellungen" (A. Leemann).

[2]) Daran wird auch durch eine Umtaufung der „resinogenen" in eine „sekretogene" Schicht nichts geändert (A. Tschirch, Die Membran als Sitz chemischer Arbeit, Arch. d. Pharm., 1914, CCLII, S. 537).

[3]) F. W. Dafert und R. Miklauz, Unters. üb. d. kohleähnliche Masse der Kompositen, Denkschr. Wien. Akad., 1911, LXXXVII, Sep.

[4]) T. F. Hanausek, Über ein neues Vorkommen von Phytomelan; zugleich ein Beispiel für die Verwertung desselben als diagnostisches Mittel, Arch. f. Chem. u. Mikrosk., 1913, VI, S. 294.

[5]) C. Griebel, Über das Vorkommen von Phytomelan im Wurzelstock von Inula Helenium, Zeitschr. f. Unters. Nahrungs- u. Genußmittel, 1913, XXV, S. 555.

Die Phytomelane stehen entwicklungsgeschichtlich mit der Mittellamelle in Beziehung, die nach Hanausek zur „melanogenen Schicht" wird. Ihre Entstehung erfolgt: 1. „an den Bastfasern mit Bildung einer primären erst farblosen, dann braunen Haut" (in den meisten Fällen, dann als zusammenhängendes Netz mit Reagentien isolierbar), 2. „an den Bastfasern ohne Bildung einer primären Haut" (selten, Arnica, dendritische Massen, Bidens, Xanthium), 3. „innerhalb des Sklerenchyms (sklerosierten Parenchyms)", in Sclerocarpus und in Heliopsis und in Wurzeln.

In der Alantwurzel fand Hanausek und nach ihm Senft[1]) die Phytomelane im Parenchym und zwar auch im Zellinnern. Sie bilden sich zwar auch hier in der Mittellamelle, gelangen aber durch eine Art Auflösung, die auch die Zellmembranen erfaßt, ins Innere der Zelle.

E. Senft[2]) hält die in dem Hymenium der Flechte Biatora fusca vorkommenden schwarzen Körperchen für Phytomelan. Der Prozeß der regressiven Stoffmetamorphose scheint nach demselben Autor bei den Flechten und Pilzen selten so weit zu gehen, daß es zur Bildung von Phytomelanen kommt, dafür scheinen deren Vorstufen, Humifizierung und Karbonisierung der Membranen, sehr häufig. Senft sieht in den so veränderten Hyphen ein mechanisches und wasserleitendes Gewebe und faßt auch ins Auge, daß die Humifizierung gegen Fäulnis schützt, wie in noch vermehrtem Grade die Phytomelanbildung.

Nach den umfassenden Untersuchungen von Hanausek[3]), der 600 Arten untersuchte und mit Senft physiologische und pathologische Phytomelane unterscheidet, kommen Phytomelane in vielen Kompositenfrüchten vor; in Veronieen, Astereen, Anthemideen, Calenduleen, Arctotideen sind sie bisher noch nicht gefunden; den Cichorieen fehlen sie. Die braunschwarzen Massen[4]) wurden für eingetrockneten Milchsaft (Greenish) und Farbstoff (Harz, Pfister) angesprochen oder kurz als Sekret bezeichnet (Hartwich). Hanausek bringt zuerst ihr mikrochemisches Verhalten in Zusammenhang mit Kohle, Gerdts tritt für reine Kohle ein, was Ebert bezweifelt. Die makrochemische Analyse hat den hohen Kohlenstoffgehalt bestätigt.

---

[1]) E. Senft, Über Phytomelane in der Alantwurzel (Inula Helenium), Pharm. Post, 1914, XLVII, S. 207.

[2]) E. Senft, Über das Vorkommen der sog. Phytomelane und über die humifizierten Membranen bei Kryptogamen, Pharm. Post, 1913, XLVI, S. 852.

[3]) T. F. Hanausek, Die „Kohleschicht" im Perikarp der Kompositen, Sitzgsber. Wien. Akad., 1907, CXVI,$_1$; S. 3; Neue Mitt. über die sog. Kohleschicht der Kompositen, Wiesner Festschr., 1908, S. 139; Unters. über die kohleähnliche Masse der Kompositen, Denkschr. Wien. Akad., 1911, LXXXVII, S. 93; Über Phytomelane, Pharm. Post, 1913, XLVI, S. 937.

[4]) O. Heineck (Zur Kenntnis des feinen Baues der Kompositen. Diss. Gießen 1890, S. 13) betrachtet sie fälschlicherweise als Kutikula.

Die Phytomelane bilden meist Netze von wunderbarer Zierlichkeit oder Platten, die dem freien Auge als feine Haare erscheinen (Hanausek). Zum Studium dienen bei Wurzeln und Früchten dickere Epidermis- und Tangentialschnitte, die nach Behandlung mit stärkeren Aufhellungs- und Mazerationsmitteln die schwarzbraunen Massen gut erkennen lassen. Die Massen sind unlöslich in Wasser, Glyzerin, Chloralhydrat, Salzsäure, Kalilauge, Ammoniak, Weingeist, Äther, Essigäther, Amylalkohol, Benzol, Anilin, Toluol, Chloroform, Azeton, Schwefelkohlenstoff, Petroläther, Terpentinöl u. dgl. Königswasser, Schwefelsäure, Salpetersäure sind ohne sichtbare Einwirkung, selbst beim Kochen. Daher benutzt man zur Isolierung Kaliumchloratsalpetersäure oder Chromschwefelsäure (S. 153 und 752). Nach Schmidt und Duysen[1]) ist Chlordioxydessigsäure ein Lösungsmittel für Phytomelane. Kieselsäure fehlt, doch hat Ebert beim Erhitzen auf dem Platinblech Schrumpfungen beobachtet und nach Gerdts löste sich ein Teil der veraschten Substanz in Säuren unter Kohlensäureentwicklung. Beide Angaben finden durch die jetzt ermittelte Zusammensetzung nur zum Teil ihre Erklärung. Ebert hat bei Xanthium und Coreopsis nach der Veraschung Eisenreaktion erhalten, läßt es aber fraglich sein, ob das Eisen aus dem benachbarten Gewebe oder aus den schwarzen Massen stammt. Im Gewebe werden die Phytomelane wohl nicht in chemisch reiner Form vorliegen, so daß Beimengungen von Eisen in verschiedenen Fällen nicht ausgeschlossen sind (Fig. 181).

Fig. 181. Phytomelane (*m*), *a*) Arnica montana (Fruchtwand, Querschnitt), *b*) nach Ebert ein isoliertes Stück von Xanthium strumarium (Flächenansicht)

Die große Widerstandsfähigkeit der Phytomelane gegen Reagentien besitzen auch die Kerngummimassen (S. 356), besonders die der Farbhölzer und der Ebenhölzer. Die Entstehungsweise dieser Substanzen ist noch nicht aufgeklärt. Überwiegend wird eine Bildung aus dem Plasma angenommen. Doch scheint sich auch die Membran, wenn auch nur sekundär, daran zu beteiligen. „Die Libriformfasern (bei Diospyros) sind dickwandig; je mehr Gummi sie im Lumen aufspeichern,

---

[1]) E. Schmidt und F. Duysen, Zur Kenntnis pflanzlicher Inkrusten II, Ber. deutsch. chem. Ges., 1921, LIV, S. 3241.

um so dünnwandiger werden sie“, sagt Molisch[1]), der ebenso wie Belohoubek[2]) die Füllmassen der Ebenhölzer für Humussäuren und Humuskohle deutet, was Praël (Lit. S. 154) und Will (Lit. S. 356, 4) verneinen. Im reaktionellen Verhalten bestehen zwischen den Phytomelanen der Kompositen und den Ebenholzmassen Unterschiede. Die Ebenholzmassen werden durch Kaliumchlorat-Salzsäure entfärbt und sind dann in Weingeist löslich.

Schleimmembran

Als Schleimstoffe bezeichnen wir solche Stoffe, die in Wasser stark quellen oder sich darin zu stark viskosen Flüssigkeiten lösen, aus denen sie wieder durch Weingeist gefällt werden. Im Tierreich, aus dem der Begriff Schleim stammt, wiegen die stickstoffhaltigen, im Pflanzenreich die stickstofffreien Schleime vor. Die typischen pflanzlichen Schleimstoffe sind Polysaccharide, die bei der Hydrolyse verschiedene Zucker, darunter häufig Galaktose und Arabinose geben; auch mit dem Auftreten von Uronsäuren (Glykuronsäure, Galakturonsäure) ist zu rechnen. Je nach ihrer Zusammensetzung haben die Schleimstoffe verschiedene Eigenschaften; es ist deshalb nicht möglich, sie alle mit einem und demselben Reagens nachzuweisen.

Da unsere Kenntnis über die Pflanzenschleime noch in vieler Hinsicht lückenhaft ist, so empfahl Ruhland[3]), als Schleime nur alle quellbaren, nicht fadenziehenden, membranbildenden Polysaccharide zusammenzufassen. Zur Einteilung der Schleime benutzte schon Frank[4]) die Entwicklungsgeschichte und unterschied Schleime (und Gummi), die im Inhalt von Interzellularkanälen auftreten (Cycadeen, Marattiaceen), im Zellinhalt (Orchis), sowie aus der „Zellhaut“ (sekundäre Membran) entstehen (Linum, Plantago, Malvaceen).

Die Pflanzenschleime sind fast ausschließlich Membransubstanzen. Sie entstehen sehr frühzeitig, zum Teil durch Umwandlung bereits vorhandener Membranen (Interzellularschleime höherer Pflanzen und der Algen aus der Mittellamelle). Die meisten Schleime werden direkt als Schleimmembran angelegt, dann ist die sekundäre Membran eine Schleimschicht. Bereits Naegeli und Cramer[5]) faßten die Schleime aller Samen, der Wurzeln und der Cacteen als Verdickungsschichten auf und brachten sie in Gegensatz zum Gummi. Werden die sekundären Schleimschichten nur auf einer Seite der Zellen angelagert, dann sind sie zuweilen durch eine feine Zelluloselamelle von dem Zellumen ab-

[1]) H. Molisch, Vgl. Anatom. d. Holzes d. Ebenaceen und ihrer Verwandten, Sitzgsber. Wien. Akad., 1879, LXXVIII, Sep. S. 14.

[2]) Belohoubek, Sitzgsber. böhm. Akad., Prag 1883, S. 384.

[3]) W. Ruhland, Ber. deutsch. bot. Ges., 1906, XXIV, S. 393.

[4]) A. B. Frank, Über die anatomische Bedeutung der vegetabilischen Schleime, Jahrb. f. wiss. Bot., 1867, V, S. 198.

[5]) C. Naegeli und Cramer, Phys. Unters., Zürich, Fr. Schultess, 1885.

gegrenzt (epidermale Schleimzellen der Blätter, Cassia, Tilia). Nach einigen Autoren wird der Schleim von Althaea (Hartwich)[1]) und anderer Malvaceen, der Tiliaceen, Sterculiaceen, Rhamnaceen u. a. (Lauterbach[2]), Trécul)[3]) innerhalb des Plasmaschlauches gebildet; Frank und Wigand[4]) bezeichneten ihn als Membranschleim; nach de Bary (Vergl. Anat. S. 151) ist diese Schleimmasse „ihrer Entstehung und morphologischen Bedeutung nach nichts anderes als eine auf Kosten des Innenraumes stark verdickte Zellwand"; ihnen schließen sich Tschirch und Walliczek (Lit. 280, 2) an. Nach diesen Autoren entstehen die Membranschleime „durch Ausscheiden einer Schleimlösung seitens des Plasma zwischen der primären Zellmembran und dem Plasma" (Fig. 182). Die Orchisschleime sollen nach Frank (a. a. O. S. 161), A. Meyer[5]) und Hartwich[6]) innerhalb des Plasmaschlauches entstehen.

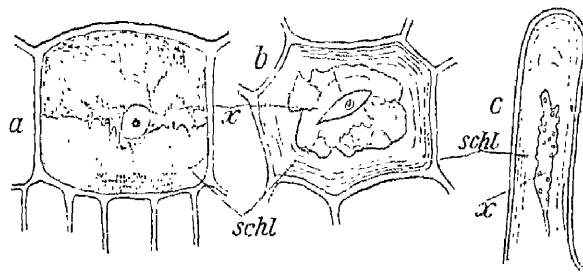



Fig. 182. Schleimbildung (lebendes Material, Alkohol-Pikrinsäure), *a*) Cassia angustifolia (Blatt, junge Epidermiszelle, Beziehung des Zellkernes zur Schleimbildung?), *b*) Althaea officinalis (Blatt, Epidermiszelle, Flächenansicht), *c*) Helianthemum spec. (Epidermis d. Samen, Amylodextrinkörner im Protoplasma); x = Protoplast, *schl* = Schleim (Tunmann)

Die Endospermschleime treten nach Frank, Tschirch und Nadelmann[7]) zuerst ebenfalls in den Vakuolen des Plasmas auf und werden dann der Wand angelagert. Auch der Schleim der Marchantiaceen ist

---

[1]) C. Hartwich, Schleimzellen von Althaea, Pharm. Centralh., 1891, XXXII, S. 586 und Nat. Vers. Halle.

[2]) Lauterbach, Bau und Entwicklung der Sekretbehälter der Cacteen, Bot. Centralbl., 1889, XXXVII, S. 371.

[3]) A. Trécul, Des mucilages chez les Malv., Sterculiac., Cact. et Orchid. indigènes, 1862, S. 314.

[4]) A. Wigand, Über die Deorganisation der Pflanzenzelle, Jahrb. f. wiss. Bot., 1864/65, III, S. 149.

[5]) A. Meyer, Die Knollen der einheimischen Orchideen, Arch. d. Pharm., 1886, CCXXIV, S. 325.

[6]) C. Hartwich, Über den Schleim der Salepknollen, Arch. d. Pharm., 1890, CCXXVIII, S. 563.

[7]) Nadelmann, Über die Schleimendosperme der Leguminosen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1890, XXI, S. 609.

nach Prescher[1]) eine Absonderung des Protoplasten und wird als Membranschleim abgelagert. — Die Schleimüberzüge, die die Oberfläche der Pflanzen bedecken, stammen teils aus Drüsen (Fig. 183), teils aus epidermalen Zellen. — Von den Raphidenschleimen wissen wir nur, daß sie nach den Kristallen erscheinen (s. S. 957 und auch Gallertausscheidungen der Algen).

Für die Bildung des Schleims der schizogenen Schleimbehälter von Ceratozamia mexicana und der hysigenen von Opuntia camanchica macht es Dannehl[2]) wahrscheinlich, daß der Pflanzenschleim im Protoplasma der sezernierenden Zellen entsteht und durch feine Poren hindurch in die Schleimbehälter gepreßt wird.

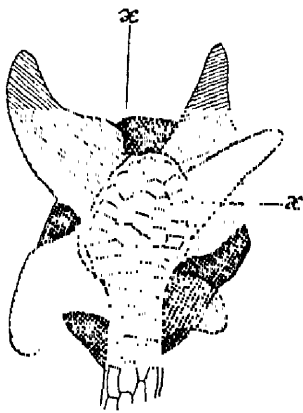



Fig. 183. Schleimdrüsen von Viola mit mehreren Schleimergüssen; bei x ist die Kutikula gesprengt (Tunmann)

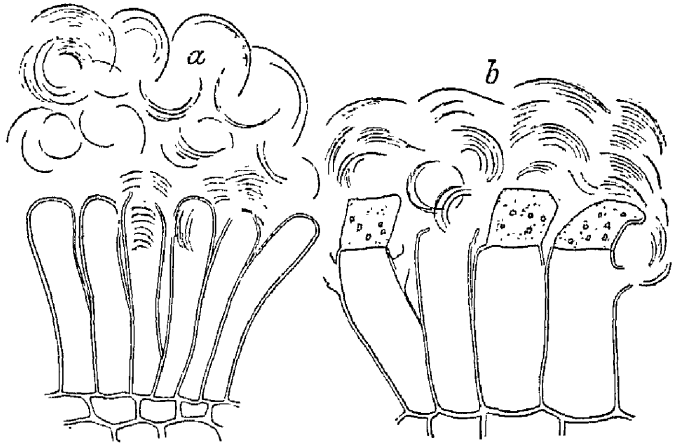



Fig. 184. Schleimentleerung der Samen bei starker Wasserzufuhr (mit Methylenblau), die Zellen zum Teil gesprengt und zerrissen; *a*) Cydonia vulgaris, *b*) Linum usitatissimum, die anhängenden Kutikulafetzen zeigen Abdrücke der Stäbchen (Tunmann)

Die Schleime kommen im ganzen Pflanzenreiche vor und sind für viele Familien typisch. Sie finden sich in allen Teilen der Pflanzen. Wir unterscheiden Schleimzellen, Schleimlücken und Schleimgänge. Ein vollständiges Verzeichnis schleimführender Pflanzen bei H. Solereder (Lit. S. 225, 1). Die Urticaceen wurden eingehend von P. Guérin studiert (Bull. Soc. bot., 1910, LVII, S. 399).

Knospenschleime dienen als Transpirationsschutz, Inhaltsschleime zur Wasserspeicherung und nach W. Peyer (Biolog. Unt. üb. Schutzstoffe, Flora, 1911, CIII, S. 441) zum Schutz gegen Tiere (Althaea, Symphytum). Orchisschleim nimmt hier ebenfalls eine Sonderstellung ein und ist Reservestoff. Auch die Endospermschleime sind Reservestoffe. Bei Zutritt größerer Wassermengen gelangt der Epidermalschleim der Samen durch Sprengung der Zellen und der Kutikula an die Oberfläche (Fig. 184), was beim Einlegen von Schnitten meist nicht der Fall

---

[1]) R. Prescher, Die Schleimorgane der Marchantiaceen, Sitzgsber. Wien. Akad., 1882, LXXXVI,$_1$, S. 132.

[2]) H. Dannehl, Über die Bildung schizogener Schleimbehälter bei Ceratozamia und lysigener Schleimlücken bei Opuntia, Bot. Arch. 1930, XXIX, S. 92.

ist. Bei Schleimdrüsen erfolgt der Austritt nur an einzelnen Stellen der Kutikula und kann wiederholt vor sich gehen, da die subkutikulare Schleimbildung andauert (Fig. 183).

Die Schleime sind stark lichtbrechend. Nach Mangin sollen nur Zelluloseschleime doppelbrechend sein. Nach Tunmanns Beobachtungen sind sämtliche Schleime doppelbrechend, wenn sie trocken unter Deckglas betrachtet werden oder wenn Alkoholmaterial vorliegt. Erst bei Wasserzufuhr, beim Lösen, schwindet die Doppelbrechung langsam. In Trockenpräparaten von Linum erscheint der Schleim bei gekreuzten Nicols tiefgelb, bei Wasserzutritt grau; er verblaßt schließlich. Zuweilen ist ein dunkles Kreuz sichtbar (Handelspulver deutscher Althaea und bei Orchis)[1]).

Ohne Anwendung von Reagentien zeigen die Schleime nur in wenigen Fällen eine feinere Struktur[2]). Diese tritt erst nach Behandlung mit Reagentien hervor. Es zeigen sich dann Schichten, zuweilen auch radiale Streifen, oder in den homogenen Massen radiale Risse, tüpfelartige Kanäle, ferner körnige Fällungen u. dgl. Selbst das Alter der betreffenden Organe kann von Einfluß auf die Struktur sein, so ist der Schleim jüngerer Samenhaare von Lythrum salicaria homogen, der älterer Haare strahlig radial und körnig[3]).

Die Schleime quellen in Wasser leicht auf, viele lösen sich sofort (zu den Ausnahmen zählt der Schleim von Cinnamomum cassia, der schwer wasserlöslich ist). Zum Studium muß die Quellung verzögert werden. Hierzu dient in erster Linie Alkohol. Daher wird meist Alkoholmaterial (absoluter Alkohol) oder getrocknetes und in feuchter Kammer erweichtes Material benutzt. Bei Objekten, bei denen im lebenden Zustande der Schleim beim Schneiden leicht ausfließt (Orchis, Symphytum) ist getrocknetes Material vorzuziehen. Alkohol fällt und härtet den Schleim, wobei er sich häufig gelb, selbst braun (Marchantiaceen, Prescher) färbt. Läßt man zu Alkoholpräparaten vorsichtig verdünnten Alkohol treten, den man durch Wasserzusatz weiter verdünnt, dann erfolgt Quellung (Frank). Gewöhnlich treten hierbei die Schichten deutlicher hervor. Schichtenbildung spricht oft (nicht immer) für die Membrannatur des Schleimes. Wird die Quellung unterbrochen und tritt bei erneutem Zusatz von Alkohol wiederum Kontraktion ein, so ist damit ein Beweis für die Schleimnatur einer Schichte erbracht.

---

[1]) Die Schleimballen von Orchis leuchten in den peripheren Teilen gelb, in den zentralen Teilen blauviolett im polarisierten Lichte.

[2]) Die lebenden Schleimzellen der Zimtrinde zeigen Schichtung.

[3]) Grütter, Über Bau und Entwicklung der Samenschleime einiger Lythrarieen, Bot. Ztg., 1893, LI, S. 1.

Doch kommen Abweichungen vor. Der Schleim der Samenhaare der Lythrarieen wird durch Alkohol dermaßen gehärtet, daß er sogar bei längerem Kochen mit verdünnter Kalilauge nicht mehr zum Quellen gebracht werden kann! — Auf die Einwirkung des Alkohols und auf seinen Konzentrationsgrad wird zum Teil die Veränderung des Schleimes der Haare der Musafrüchte beruhen, für welche Jähkel (Lit. S. 924, 1) keine Erklärung beibringen kann. Durch mehrjährige Einwirkung von Alkohol war der Schleim knorpelig geworden, löste sich in heißem Wasser und quoll nicht in Kalilauge und Eau de Javelle. Nach zweitägiger Mazeration mit Salzsäurealkohol (1—3 Teile Säure, 3—4 Teile Alkohol) löste er sich leicht in Wasser. Reine Salzsäure und eine Mischung von 4 Teilen Salzsäure und 1 Teil Alkohol waren wirkungslos. Der Schleim einer vor acht Jahren lebend in 90proz. Alkohol eingelegten Althaeawurzel ist unter Deckglas unlöslich in Wasser, Chloralhydrat und Kupferoxydammoniak. Es kommt offenbar nicht nur auf die Natur des Schleimes und auf den Alkohol allein an, sondern auch auf die anderen in der Pflanze befindlichen Körper (Säuren ?). — Auch Strukturänderungen ruft der Alkohol hervor; im natürlichen Zustande homogene Schleime erhalten Schichtung, Cacteenschleime nach Longo (Just Jahrb., 1896, I, 482) Schwammstruktur.

Glyzerin kann oft Alkohol ersetzen, die Quellungserscheinungen sind ebenfalls von dem Konzentrationsgrad des Reagens abhängig. In konzentriertem Glyzerin halten sich viele Schleime augenscheinlich unverändert. Messungen zeigten, daß in geschlossenen Zellen bei Orchis- und Althaeaschleimen (gut verkittete Deckglaspräparate) nach einem Monat nur geringe Quellungszunahme erfolgt war. In verdünntem Glyzerin tritt mehr oder weniger rasch Verquellung ein. Konzentrierte Rohrzuckerlösung leistet in vielen Fällen ebenfalls gute Dienste (Orchis, Scilla, Althaea, Sinapis u. a.). Walliczek, der gegenteiliger Ansicht ist, hat wahrscheinlich keine konzentrierte Lösung benutzt. Der Schleim des Saleppulvers wird selbst nach mehreren Tagen wenig angegriffen.

Alkohol und Glyzerin sind die Hauptreagentien und wurden früher fast ausschließlich benutzt[1]). Als weitere Beobachtungsflüssigkeit empfiehlt Walliczek Rizinusöl-Alkohol (1 + 1). Die Schichtung des Alkoholmaterials bleibt erhalten, Quellung erfolgt nicht, die Präparate werden aufgehellt. Zu Dauerpräparaten läßt man unter Deckglas den Alkohol des Gemisches verdunsten und schließt dann ein. Ohne Antiseptikum fand Tunmann die Präparate nur kurze Zeit halt-

[1]) Auch von Flückiger, Buccubl., Schw. Wchschr. Chem. u. Pharmaz., 1873, XI, 435.

bar. Rizinusöl erschwert eine Weiterbehandlung der Schnitte. Vielfach ist Bleiessig (Orchis, A. Meyer) ein gutes Gerinnungs- und Härtungsmittel. Alkoholmaterial, mit Bleiessig behandelt, gestattet zuweilen Entfernung der Stärke. Cacteen-, Barosma-, Cassiaschleim quillt auch in Bleiessig (Walliczek). Mangin (Lit. S. 931, 2) hat ferner Eisenvitriol, Quecksilberchlorid und -azetat, Alaun und Chromalaun zur Gerinnung herangezogen. Doch stehen alle diese Mittel insofern dem Alkohol nach, als sie nur für bestimmte Fälle brauchbar sind, bei anderen versagen. Alaun bringt den Schleim des gewöhnlichen Leins zum Gerinnen, aber nicht den des großblumigen. Zudem kann bei Alkoholhärtung mit allen Farben gefärbt werden, während man bei der Wahl der anderen Härtungsmittel gleich die später anzuwendenden Farbstoffe berücksichtigen muß.

Zum Färben der Schleime bediente man sich anfangs ausschließlich der Jodreagentien. Jodjodkalium färbt die Schleime nur sehr schwach gelb (Cydonia rötlich), während das (eiweißhaltige) Plasma weit kräftiger gefärbt wird, doch kommt gleichzeitig der Schleim zum Quellen. Bessere Erfolge geben Jodglyzerin, alkoholische Jodlösung mit nachfolgendem Glyzerinzusatz oder Jodzuckerlösung.

Der Schleim mancher Bakterien, der wahrscheinlich durch Verquellung der äußeren Membranschichten entsteht, färbt sich bei B. Pasteurianum und B. Kützingianum hellblau mit wenig Jodjodkalium (A. Meyer, Chlamydosp. u. Zellmembr. b. Bakt., Ber. bot. Ges., 1901, XIX, 428). Die Schleimfäden der Bakterien in den Wurzelknöllchen der Papilionaceen werden mit Chlorzinkjod in ihrer ganzen Dicke blau, die eingeschlossenen Bakterien nehmen dabei gelbbraune Färbung an (W. Beijerinck, Nat. d. Fäden d. Papilionaceenknöllchen, Zentralbl. Bakt., 1894, XV, 728). Auch die Schleimschicht in den Drüsenflecken von Populus nigra wird durch Jodjodkalium gebläut (Tunmann).

Mit Jodschwefelsäure (Ausführung S. 905) färben sich einige Schleime blau bis violett (Salvia, Hofmeister, 1858, Cydonia, Kützing, 1852, Cruciferen[1]), Cramer, 1855), die meisten werden nur gelb oder bleiben farblos (Marchantiaceen, Orchis, Trigonella, Althaea, Linum). Erstere wurden von Tschirch (Anat., S. 193) als Zelluloseschleime, letztere als echte Schleime bezeichnet. Die Reaktion läßt aber keine sichere Deutung zu und die Tschirchsche Unterscheidung in echte und unechte Schleime ist aufzugeben. Denn gerade bei Linum, Salep und anderen, die mit Jodschwefelsäure gelb werden, also echte Schleime wären, hat die makrochemische Analyse (Tollens) einen Zellulosegehalt ergeben. Überdies treten beide Färbungen sogar an dem gleichen

---

[1]) d'Arbaumont, Nouv. observ. s. les cellules á mucilage des graines d. Crucifères, Ann. sc. nat. Bot., 1889, II, S. 125.

Objekte auf. Nach Schaar[1]) werden die Schleimschichten der Antheridien von Polytrichum mit Jodschwefelsäure zunächst gelbbraun, später erst blau. Die Reaktion tritt in der Mittellamelle zuerst und am stärksten auf. Außerdem ist bei Samen das Entwicklungsstadium von Einfluß. Bei Magonia glabrata (O. Rosenberg, Lit. S. 845, 4) wird der Schleim noch kurz vor völliger Reife der Samen mit Chlorzinkjod intensiv blau (Stärke fehlt), während bei vollständig ausgereiften Samen der Schleim sich mit Jodreagentien nicht mehr färbt. Die Gummischleimmembran im Perikarp der Tarihülsen wird blaugrau (Hanausek, Lit. S. 388, 2). Hingegen sind die Jodreagentien geeignet, um „plasmatische" Fäden, die den Schleim durchsetzen, (und die in älteren Schleimzellen deutlicher ausgebildet sind als in jungen), besser sichtbar zu machen (Orchis, Aloe).

Zuweilen (Pektinschleim der Mittellamelle) hat den Jodreaktionen eine Vorbehandlung der Schnitte mit verdünnter Kalilauge (bis mehrere Tage) voranzugehen. Die Interzellularschleime der Algen, die mit Jod meist nur gelb werden, zeigen nach der Reinigung mit Kalilauge Zellulose- und Hemizellulosereaktionen. — Soll Jodschwefelsäure zur Ermittlung von Zellulose in Schleimen dienen, dann muß die Reaktion an „gereinigten Schleimen" vorgenommen werden. Die Reinigung wird oft schwierig sein. Der Schleim müßte zuvor derart gehärtet werden, daß eine Alkalibehandlung durchführbar wäre.

Kupferoxydammoniak löst viele (Symphytum, Plantago), doch nicht alle Schleime, oft mit intensiv blauer Farbe (Trigonella); andere Schleime quellen sehr stark auf (Orchis). Der Schleim von Althaea wird nicht gelöst, der von Linum bildet eine feste Gallerte.

Bei der Reaktion mit Kupfersulfat-Kalilauge (A. Meyer) werden die Schnitte einige Minuten in konzentriertem wässerigem Kupfersulfat belassen (nur aus den angeschnittenen Zellen quillt der Schleim heraus) und dann in Ätzkali (50proz.) übertragen[2]). Die Schleime von Orchis (A. Meyer) und der Malvaceen (Nestler) werden blau.

Seit Hanstein (1868) werden Anilinfarben zur Charakteristik herangezogen. Mangin teilt die Schleime in verschiedene Gruppen: Zelluloseschleime (sind selten, Orchis) werden durch Salzsäure-Alkohol völlig unlöslich und durch Jodreagentien kaum verändert; sie sind doppelbrechend und färben sich in saurem Bade mit

---

[1]) F. Schaar, Bau und Art der Entleerung der reifen Antheridien bei Polytrichum, Ber. deutsch. bot. Ges., 1897, XV, S. 479.

[2]) Einfacher ist es, die Schnitte direkt in alkalische Kupferlösung einzutragen oder damit zu erwärmen.

Orseillin BB, Azorubin, Naphtholschwarz u. a., in alkalischem Bade mit Kongorot, Deltapurpurin, Benzopurpurin. Pektoseschleime (Malvaceen, Rosaceen, Tiliaceen, Cycadeen u. a.) geben fadenziehende Lösungen, werden durch Bleiazetat, Sublimat, Alaun und Eisenvitriol zur Gerinnung gebracht, durch Jodreagentien gelb gefärbt. Sie färben sich in neutralem Bade mit Bismarckbraun, Methylenblau, Methylgrün, Hämatoxylin[1]), Neutralrot. Diese Färbungen sind nur in 1—2proz. Borsäure einige Zeit haltbar und schwinden schnell in Weingeist, Glyzerin und Säuren. Hingegen gibt Rutheniumrot haltbare Färbungen; man läßt die gefärbten Schnitte an der Luft eintrocknen und schließt sie in Kanadabalsam ein (Linum, Plantago, Psyllium, Cydonia, Cruciferen, Malvaceen). Nach Mangin sollen diese Schleime optisch inaktiv sein (s. S. 579). Calloseschleime (finden sich in Geweben, die der Auflösung entgegengehen) sind optisch inaktiv, lösen sich ohne Quellung in verdünnter Natron- und Kalilauge, quellen auf ohne sich zu lösen in alkalischen Karbonaten und Ammoniak. Sie färben sich in saurem Bade (Essigsäure) mit Anilinblau, in alkalischem Bade mit Rosazurin. Auch Corallin-Soda färbt. Diesen „einfachen" Schleimen stellt Mangin „gemischte" Schleime gegenüber; besonders verbreitet sind Gemische von Zellulose- und Pektoseschleimen.

Es ist nicht möglich, auf Grund von Färbungen die Natur eines Schleimes zu bestimmen, ganz abgesehen davon, daß mit dem Auftreten von Mischschleimen zu rechnen ist. So färbt wässeriges Kongorot (Heinricher, Lit. S. 910, 3) dunkelorangerot die Schleime von Althaea, Linum, Plantago Psyllium, Cydonia, Lepidium sativum, Orchis (lebendes und Alkoholmaterial). Der Schleim der Raphidenzellen der Meerzwiebel wird von wässerigem Kongorot orangerot (Hartwich) gefärbt, ebenso der Antheridienschleim von Polytrichum (Schaar). Eine Lösung in 70proz. Alkohol färbt Cacteenschleim, nicht aber den von Tilia (Walliczek). Der Schleim der Drüsen von Gunnera magellanica speichert Methylenblau und Bismarckbraun, nicht aber Kongorot und Jodreagentien[2]). Der Schleim der Haare der Acanthaceensamen färbt sich mit Methylgrün, Methylviolett, Kongorot und Safranin[3]). Die Malvaceenschleime werden mit weingeistigem Safranin orange, mit Alkanna stahlblau, mit weingeistigem

---

[1]) A. Giraud, Du développement et de la localisation des mucilages chez les Malvacées officinales, Toulouse, Thèse, 1894, S. 6. Die Färbungen mit Hämatoxylin sind violett (Cydonia) bis blau (Malvaceen).

[2]) J. Reimnitz, Morph. u. Anat. von Gunnera magell., Diss. Kiel 1909.

[3]) E. Schaffnit, Beitr. z. Anat. der Acanthaceensamen, Bot. Centralbl., Beih., 1906, XIX, S. 453.

Methylenblau blau[1]). Hansteins Anilingemisch (S. 354) färbt den Schleim von Orchis rötlichgelb, den der Cacteen rötlich (Walliczek) und gibt bei Malvaceen, Urticaceen, Linum, Plantago, Cinnamomum cassia, Trigonella violettrote Färbungen (Tunmann). Corallin (S. 918) färbt Orchis orangerot (Hartwich), Endospermschleime schlecht (Nadelmann). Rutheniumrot färbt Cycadeen, Linum, Cydonia, Malvaceen, Cruciferen, Plantago, aber nicht Orchisschleime. — Bei Färbungen von lebendem oder Weingeistmaterial muß der Farbstoff entweder in wässeriger oder in verdünnter Lösung (50—70 % Alkohol) angewandt werden. Farblösungen, die mit konzentriertem Alkohol hergestellt sind, färben meist nicht. Bei entwicklungsgeschichtlichen Studien muß man den Schleim vom Plasma unterscheiden. Diese Differentialdiagnose ist nicht leicht. Selbstverständlich muß man zur Beobachtung intakte Zellen wählen. Am schwierigsten ist die Feststellung des Hyaloplasmas. Ob die Plasmahaut stets mit Sicherheit identifiziert wurde, bleibt fraglich. Hierzu werden Doppelfärbungen empfohlen (Mangin). Bei Pektoseschleimen färbt ein Gemisch von Naphthylenblau und Säuregrün JEEE Plasma grün, Schleim blau, bei Calloseschleimen ein Gemisch von Anilinblau und Bismarckbraun Plasma violettschwarz, Schleim blau. Walliczek legt die mit Eosin oder Nigrosin in 70proz. Weingeist gefärbten Schnitte in absoluten Alkohol, bis sich der Schleim entfärbt hat, „während der Plasmakörper durch den gehärteten Schleim verhindert wird, seine Farbe abzugeben". Meist wurden aber die Untersuchungen an Weingeistmaterial ausgeführt und nähere Angaben über die Konservierung (Stärke des Weingeistes) nicht gemacht; hierdurch können schwerwiegende Irrtümer entstehen. Ganze Orchisknollen, die längere Zeit in 80proz. Weingeist gelegen hatten, zeigten eine „zentrale Höhlung" im Schleime, die bekanntlich für Membranschleim charakteristisch ist. Erforderlich sind stets Nachprüfungen an lebendem Material. Ausgedehnte Verwendung verdiente die an lebenden Zellen ausgeführte Plasmolyse (Neutralsalzen) mit nachfolgendem Fixieren, sowie in einigen Fällen polarisiertes Licht.

Zur Färbung von Schleimen verwendet Gertz[2]) Molybdänblau[3]) Mo_3O_8. Es färbt pflanzliche Schleim- und Gummiarten — negativ

---

[1]) A. Nestler, Die Schleimzellen der Laubblätter der Malvaceen, Österr. bot. Zeitschr., 1898, XLVIII, Nr. 3, Sep.

[2]) O. Gertz, Om användningen av molybdenblått i botanisk mikroteknik, Bot. Notiser, 1923, S. 65; Ref. in Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1924, XLI, S. 133.

[3]) Darstellung. Eine Lösung von 1,5 g kristallinischem Ammoniummolybdat [$5\,(NH_4)_2MoO_4$, $7\,MoO_3 + 7\,H_2O$] in 25,0 g destilliertem Wasser wird nach Zu-

die verschleimten Wände von Tilia —, Stärke nur nach der Verkleisterung, Zellulose nach der Behandlung mit Schwefelsäure, Zystolithen nach Entkalkung.

Zum Nachweis der Schleimepidermis des Leinsamens empfiehlt Lipták[1]) Phosphormolybdänsäure.

Zur Färbung der Schleimschicht der Umbelliferen-Sekretbehälter benutzte Elias (l. c. S. 942, 2) vorzugsweise eine wässerige 3proz. Lösung von Jodgrün, das die Schleimschicht hellgrün (das Sekret blau) färbt. Konzentrierte Kalilauge und Ammoniak lösten einen Teil des Schleims unter Gelbfärbung. Zusatz von Chlorzinklösung erwies die Schleimschicht als mehrschichtig. Jodschwefelsäure färbte einzelne Streifen des Schleimes tiefblau, den Rest — wie auch Chlorzinkjod — gelbbraun, Kupferoxydammoniak löste einzelne Teile des Schleims.

Rosenthaler[2]) weist die Schleimzellen der Malvaceen durch die Berlinerblau-Reaktion nach. Die Schnitte kommen kurz in Ferrichloridlösung, werden gründlich mit Wasser ausgewaschen und kommen dann in eine Lösung von Kaliumferrocyanid. Die Schleimzellen heben sich durch tiefblaue Färbung von den anderen hellblau gefärbten (s. S. 893) Elementen ab. Oder man legt die Schnitte erst mindestens 5 Minuten in eine völlig klare Bleiazetatlösung, wäscht gründlich mit destilliertem, möglichst kohlensäurefreiem Wasser aus und bringt sie dann in eine Lösung von Kaliumdichromat. Der Schleim ist dann gelb gefärbt. Zum Nachweis des Schleimes in Orchisknollen eignet sich alkalische Kupferlösung, mit der sich der Schleim allmählich tiefblau färbt. Zum Nachweis des Schleimes in dem Pulver der Eibischwurzel läßt das 6. Deutsche Arzneibuch ein Tuschepräparat anfertigen. Es sollen dann in dem im übrigen vollkommen schwarzen, undurchsichtigen Präparat wasserhelle durchsichtige Gallertkugeln durch Quellung der Schleimbröckchen entstehen[3]).

---

satz von 3,5—4,0 ccm 2 N-Schwefelsäure zum Sieden erhitzt. In die noch warme Lösung wird kurz Schwefelwasserstoff eingeleitet. Die von dem schwarzen Molybdänsulfid abfiltrierte blaue Lösung ist gebrauchsfertig, kann aber noch durch einwöchige Dialyse gegen destilliertes Wasser weiter gereinigt werden.

[1]) P. Lipták, Über eine Schleimfärbung, Ref. Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1928, XLV, S. 524.

[2]) L. Rosenthaler, Mikrochemischer Nachweis von Schleim in Schleimdrogen, Pharm. Ztg., 1927, LXXII, Nr. 101.

[3]) W. Brandt, Die Drogen im neuen Arzneibuch, Arch. d. Pharm., 1926, CCLXIV, S. 636.

Schleimfärbung nach Roques[1])

I. Man bringt das Untersuchungsmaterial in essigsaure Benzidinlösung (s. S. 896), schneidet nach 48 Stunden und bringt die Schnitte entweder in Glyzerin oder nach Entwässerung in Balsam. Unendlich lange Zeit haltbar. Die Schleimzellen sind gefärbt[2]), aber auch verholzte, verkorkte und kutinisierte Elemente.

Man kann in den Schnitten dann noch die Zellulosemembranen färben, wenn man sie wäscht und 3—5 Minuten mit einem der folgenden Reagentien behandelt: 0,1proz. wässerige Methylenblaulösung, gesättigte Benzoazurinlösung (Zellulose blau, Callose violett).

II. Man bringt die Schnitte einen Augenblick in eine Ferrichloridlösung, der man einen Tropfen Formol und Spuren der essigsauren Benzidinazetatlösung zugesetzt hat, wäscht rasch mit Wasser und taucht sie dann in ein Gemisch gleicher Teile 30proz. Formols und Ferrichloridlösung (offizinelle). Die Schleimzellen färben sich sofort blau. Man wäscht die Schnitte und bringt sie in Glyzerin.

Der **Raphidenschleim**, der als sackartige, homogene oder vakuolige Hülle die Raphiden einschließt (Fig. 36, S. 169), weicht in seinem reaktionellen Verhalten meist von den Membranschleimen ab und steht den Pektinschleimen am nächsten. Zellulose führt er niemals. Er ist optisch inaktiv, quillt in Wasser unter Lösung langsam auf, schrumpft in Weingeist, bleibt in Jodzuckerlösung und Jodglyzerin sehr lange erhalten. Mit Jodreagentien färbt er sich im allgemeinen weit stärker als die Membranschleime, wird zuweilen (Urginea) mit Jodschwefelsäure rötlich. Die mit Kongorot und Corallin erhaltenen Färbungen weichen ebenfalls von denen der Membranschleime ab. Methylgrünessigsäure, Gentianaviolett, Eosin färben oft nicht. Hierher zählen auch jene Schleime, die in den sog. „unvollkommenen Raphidenschläuchen“ (ohne Raphiden) bei verschiedenen Rubiaceen, Ampelideen, Onagrarieen u. a. vorkommen.

Ein eigenartiges Verhalten zeigt der Schleim der Schleimhyphen mancher Pilze (Polyporus off.)[3]) und Flechtenpilze (in der Flechte Physma dalmaticum)[4]), der der Membran entstammt. Hyphen-

[1]) H. Roques, Sur un nouveau procédé de fixation et coloration des mucilages chez les végétaux, Compt. rend. soc. Biol., 1927, XCVII, S. 85.

P. Fourment und H. Roques, L'acétate de diphenylene-diamine fixateur et colorant microchimique des tissus végétaux renfermant le groupement moléculaires des pentosanes, Bull. trav. soc. pharm., Bordeaux 1926, LXIV, S. 22.

[2]) Die Schleimzellen des Stengels von Tilia argentea L. sind nach 10 Minuten Eintauchen gelb gefärbt, nach 24 Stunden braun, die des Leinsamens sind nach 24 Stunden schwärzlich.

[3]) Hier scheinen Beziehungen zwischen Schleim- und Harzhyphen zu bestehen (O. Tunmann, Lit. S. 150, 4 u. 326, 1).

[4]) Em. Senft, Über eigentümliche Gebilde im Thallus der Flechte Physma dalmaticum, Sitzgsber. Wien. Akad., 1907, CXVI, $_1$, S. 429.

äste und -enden oder bestimmte Strecken von Hyphen verdicken sich und nehmen dabei häufig wulstige und bizarre Formen an; ein Zelllumen ist nicht zu erkennen (Fig. 185). Die Schleimhyphen sind farblos, stark lichtbrechend, zuweilen (besonders im Alter) geschichtet, bis 250 μ groß und sehr widerstandsfähig. Sie sind unlöslich in konzentrierten Mineralsäuren und in verdünnten Alkalien, quellen sehr wenig in Kupferoxydammoniak, nach längerer Zeit etwas in Chloralhydrat und in Wasser erst nach Wochen. Jodreagentien färben gelblich. Zellulosereaktionen sind auch nach Behandlung mit Alkalien und verdünnten Säuren nicht zu erhalten. Hierher zählen jedenfalls die von Buchholz (Lit. S. 355, 5) aufgefundenen Bildungen. Bei Hymenogaster decorus „erscheinen sie wie massive Glasstäbe, hin und her gewunden, scheinbar ohne Inhalt, jedoch in Wirklichkeit ganz mit einer lichtbrechenden Substanz erfüllt".

Fig. 185.
Polyporus officinalis, Schleimhyphe (Tunmann)

Schließlich seien die Befunde von Sorauer (Ber. bot. Ges., 1912, XXX, 42) über die Schleimkrankheit von Cyathea medullaris erwähnt. Dort entstehen im Grundgewebe Schleimlakunen. Die dem Verschleimungsprozeß anheimfallenden Zellen vergrößern sich und zeigen ein durch freie Zellbildung entstandenes Maschennetz. Bei Färbung mit Methylgrün-Eosin wird das gesunde Gewebe leuchtend rosenrot, das erkrankte grün. Eisensulfat schwärzt alle Membranen, „um so intensiver, je erkrankter dieselben sind". Chlorzinkjod (frisch bereitet) färbt gesundes Parenchym tiefblau, die erkrankten Gewebe und die Schleimmasse braungelb. Bei den oben erwähnten Maschenzellen wird die Membran der Mutterzelle blau, die der Tochterzellen gelbbraun. Alizarin zeigt bei nachfolgendem Auswaschen alle erkrankten Teile und die Schleimmasse rot, das gesunde Gewebe ist entfärbt. Die Endprodukte des Verschleimungsprozesses erstarren nach dem Austritt aus der Pflanze nicht, im Gegensatz zum Gummi der Amygdalaceen. Erstere werden mit Salzsäure rot, letzterer gelb.

Gallertausscheidungen der Algen

Als Gallerte bezeichnen wir den physikalischen Zustand einer schleimigen Substanz, die bei übermäßiger Wasserzufuhr so stark verquellen kann, „daß ihr Zustand als fester Körper zu weichen anfängt" (F. Schütt, Lit. S. 713, 5). Die Gallertauflagerungen enthalten keine Zellulose (Jodschwefelsäure und Chlorzinkjod färben nicht blau), überziehen die ganzen Pflanzen (Zygnemaceen) oder nur bestimmte Teile (Desmidiaceen) und bilden einen Schutz gegen Reibung (des Wassers u. a., W. Hunger, Funktion der oberflächlichen Schleimbildung, Diss. Jena 1899). Sie werden vom Plasma teils durch Poren (Schütt), teils durch feine Kanäle aus schizogenen Gängen (Laminarien, Guignard) nach außen abgeschieden.

Die Gallerthüllen fallen in Wasserpräparaten nur wenig auf, da ihr Brechungsindex kaum von dem des Wassers abweicht. Bei starker Vergrößerung und abgestelltem Lichte sind sie besser sichtbar. Zur Sichtbarmachung bei schwacher Vergrößerung benutzt man Tuschepräparate (Errera, Einlegen der Objekte in einen Tropfen Wasser, in dem man etwas chinesiche Tusche bis zur dunkelgrauen Färbung verrieben hat) oder trägt in Dahlia, Neutralrot, Karbolfuchsin, Safranin ein. Man kann auch den Tuschepräparaten wässerige Lösungen von Thionin oder Gentianaviolett zusetzen (Schroeder)[1].

Die Gallertscheiden der **Zygnemaceen** bestehen aus einer Grundsubstanz und aus Einlagerungen (Klebs, Lit. S. 910, 2). Die Grundsubstanz ist zart, sehr schwach lichtbrechend, nicht quellungsfähig, in heißem Wasser unlöslich, schwer und kaum färbbar und löst sich nur in stärkeren Säuren. Die Einlagerungen treten erst nach Behandlung mit Alkohol und nach Färbung mit nicht zu verdünnten wässerigen Lösungen[2]) von Methylenblau, Methylviolett, gerbsaurem Vesuvin und Fuchsin in Gestalt kleiner Stäbchen hervor, die sich nahe der Zellwand zuweilen zu einem feinen Netzwerk vereinigen. Sie bilden die Hauptmasse der Gallertsubstanz, lösen sich in Chlorzinkjod auf und können mit heißem Wasser ausgezogen werden. Die Scheiden nehmen in einer Lösung von 1 % Glykose und 0,5 % Pepton an Dichtigkeit zu. Die Ursache dieser Erscheinung ist nicht aufgeklärt. Klebs bringt sie mit dem Stickstoffgehalt und der leimartigen Natur der Einlagerung in Beziehung.

Charakteristisch ist die Fähigkeit der Gallerte, nach Einlagerung gewisser Niederschläge den in Wasser löslichen, stäbchenförmigen Bestandteil der Scheide zu verquellen und abzustoßen. Die Wirksamkeit der Niederschläge hängt von der Größe und der Form der Niederschlagsteilchen ab (Klebs). Deutlich kristallinische und grobkörnige Niederschläge bewirken keine Verquellung. Geeignet sind einige Eisen- und Chromverbindungen. Eine Anzahl Algen, die man in der Mitte mit einem Faden zusammenbindet, werden in 0,25proz. milchsaurem Eisenoxydul umgeschwenkt (1—2 Minuten), auf einen Augenblick durch frisches Wasser gezogen und in 0,25proz. Ferricyankalium gebracht (Turnbulls Blau). Durch Wiederholung der Reaktion gelingt es,

---

[1]) L. Errera, S. l'emploi de l'encre de Chine en micr., Bull. Soc. belge d. Micr., 1884, X, S. 478. — B. Schroeder, Gallertbildung der Algen, Verh. nat.-med. Ver. Heidelberg, 1902, VII, Heft 2 und Planktonpflanzen aus Seen von Westpreußen, Ber. d. bot. Ges., 1899, XVII, S. 156.

[2]) Verdünnte Lösungen färben die Scheiden homogen, konzentrierte bedingen Kontraktion der Scheiden.

die Scheiden tiefblau zu färben, ohne daß die Lebenstätigkeit der Algen leidet, die in reinem Wasser weiter kultiviert werden können. In gleicher Weise kann man 0,25proz. Kaliumchromat und 0,25proz. Bleiazetat benutzen. Bei den Niederschlägen geht die Abstoßung um so schneller vor sich, je weniger Turnbulls Blau oder Chromgelb eingelagert ist. Bei starker Einlagerung vollzieht sie sich erst innerhalb einiger Tage.

Bei den **Desmidiaceen** sitzen den Zellwandporen kugelige Gallertkappen auf[1]), welche in Diastase (5 Minuten bei 30—35°)[2]) stark aufquellen. Man setzt den unter Deckglas liegenden lebenden Desmidiaceen anfangs sehr verdünnte, allmählich konzentrierte Lösungen von Gentianaviolett, Fuchsin, Methylenblau, Neutralrot, ferner Methylenviolett oder Safranin zu und beobachtet die Einwirkung der Farbstoffe, die unter Wasserentziehung kontrahierend auf die Gallertmassen wirken. Bei in Weingeist gehärtetem Material läßt sich die Gallerte von der Membran durch plötzlichen starken Stoß auf das Deckglas trennen.

Bei **Protoccoideen** ist zur dauernden Färbung gerbsaures Vesuvin geeignet. Die Gallerte von Coelastrum reticulatum widersteht der Schwefelsäureeinwirkung, nimmt Farbstoffe schwer auf, Fuchsin färbt vorübergehend nach Vorbehandlung mit Chloralhydrat. Bei Dictyosphaerium pulchellum Wood. zeigt die Gallerte nach Färbung deutliche radiale Streifung. Mit Kaliumchromat-Bleiazetat entsteht ein Niederschlag von Bleichromat, doch findet hierbei keine Abstoßung statt (s. oben). Oocardium stratum Naegeli zeigt eine relativ dünne Stäbchenschicht, die nach Färbung (gerbsaures Vesuvin, wässeriges Anilinblau) scharf hervortritt und eine strukturlose amorphe Gallerte (Senn)[3]). — Die Gallertmembran von Volvox tertius erscheint deutlich geschichtet, wenn man nach Färbung mit verdünnter Methylenblaulösung eine schwache Jodjodkaliumlösung zufließen läßt. Bei dieser Methode wird die Gallerte bei V. aureus und V. globator nur körnig (Lit. S. 868, 1).

Den Färbungen der Gallertscheiden kommt bei verschiedenen Gattungen ein diagnostischer Wert zu (F. Brand, Charakt. Algen-Tinktionen, Ber. d. bot. Ges., 1907, XXV, 497). Exsikkate werden zuvor einen Tag lang in schwach essigsäurehaltigem Wasser aufgeweicht und dann auf 24 Stunden in eine verdünnte Farblösung gelegt (R. Chodat, Bull. Boissier, 1897, 302).

---

[1]) P. Hauptfleisch, Zellm. u. Hüllgall. d. Desmidiaceen, Diss. Greifswald 1888, O. Müller, Kammern und Poren in der Zellwand der Bacillariaceen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1898, XVII, S. 400 und J. Lütkemüller, Zellm. d. Desmidiaceen, Cohns Beitr., 1902, VIII, S. 347.

[2]) A. Andreesen, Beitrag zur Kenntnis der Desmidiaceen, Flora, 1902, XCIX, S. 373.

[3]) G. Senn, Über einige koloniebildende einzellige Algen, Bot. Ztg., 1899, LVII, S. 39.

Die Gallertauflagerungen der **Phaeophyceen** und **Florideen** haften den Algen so fest an, so daß sie selbst bei Drogen noch erhalten sind, auch wenn diese längere Zeit gewässert wurden. Sie verhindern oft den Eintritt von Farbstofflösungen ins Gewebe. Zur Sichtbarmachung bei Drogen eignen sich Methylenblau (violett) und Safranin (orange). Beim Erwärmen unter Deckglas ballen sich die Gallerthäute zusammen, ohne sich zu entfärben, durch Jodreagentien werden sie mehr oder weniger gelb, Kupferoxydammoniak löst sie (Chondrus) nicht (Tunmann, Lit. S. 846).

Zum Nachweis der Gallertstrukturen des Süßwasserplanktons färbt Naumann[1]) das Präparat durch Eintauchen eines blauen oder violetten Kopierbleistiftes.

Mit Prunepure und Gallocyanin MS 0,001 % färben sich die Gallertausscheidungen von Diatomeen, z. B. die Stiele von Gomphonema und Synedra intensiv karminrot (Schaede)[2]).

Gallertbildung bei Flechten

Gallertige Umbildungen erleiden bei Flechten Hyphenendigungen, die sich anheften. Tobler[3]) rechnet auch die Haftscheibenbildung hierher. Nach demselben Autor dürfte auch die Bildung der cystolithenartigen Inhaltskörper von Physma dalmaticum auf eine Vergallertung der Hyphen zurückzuführen sein. Sie sind unlöslich in Kalilauge und Schweizers Reagens, löslich in heißer Salzsäure, Schwefelsäure und Chromsäure und werden durch Anilinfarbstoffe gefärbt.

Schleim der Bakterien

In der Schleimschicht der Bakterien unterscheidet Beijerinck[4]) drei Kohlenhydrate: Dextran, Levulan und Zellulan; die beiden ersteren sollen durch die Bakterien aus Rohrzucker gebildet werden, während das letzte auch aus anderen Kohlenhydraten entstehen soll.

Leuchtende Stoffe der Rhodophyceen

Hier seien dann noch leuchtende Stoffe erwähnt, die zuerst Kny[5]) bei Chondriopsis coerulescens beobachtete und Berthold[6]) bei Chylo-

---

[1]) E. Naumann, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1918, XXXV, S. 243.

[2]) R. Schaede, Über das Verhalten von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarbstoffen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1924, XLI, S. 345.

[3]) F. Tobler, Biologie der Flechten (Berlin, Gebr. Borntraeger, 1925), S. 118.

[4]) M. W. Beijerinck, Fol. Microbiol., 1912, I.

[5]) L. Kny, Über die Morphologie von Chondriopsis coerulescens Cronau usw. Monatsber. Akad. Wiss., Berlin, Juni 1870.

[6]) G. Berthold, Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Meeresalgen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1882, XIII, S. 685; vgl. auch: Über die Verteilung der Algen im Golf von Neapel, Sonderabdr. a. d. Mitt. a. d. zoolog. Station zu Neapel, 1882, III.

cladia kalifornis Harv. näher beschrieb. Wir folgen hier den Angaben von Faber[1]), der die irisierenden Körper einer Nitophyllum- und Taenioma-Art eingehend studierte. Diese Delesseriaceen zeigen im intensiven Licht einen eigenartigen stahlblauen Glanz, der allmählich verschwindet, wenn die Algen schwächerem Licht ausgesetzt werden. Dieser Glanz wird durch irisierende Körper in den Zellen hervorgerufen. Die irisierenden Körper sind proteinartiger Natur; in ihnen entstehen unter Einfluß starken Lichtes kleine kugelartige Gebilde, die wahrscheinlich ein Assimilationsprodukt darstellen und die eigentliche Ursache des Irisierens sind.

Zur Fixierung bringt man die Objekte etwa 1 Minute in Jodmeerwasser[2]) und wäscht mit 2proz. Formalinlösung (Formalin mit Meerwasser verdünnt) so lange aus, bis alles Jod verschwunden ist. Die Färbung erfolgt am besten durch Hämatoxylin-Eosinlösung[3]). Das Sichtbarmachen der Zellinhaltskörper im Scheitel und in den ganz jungen Keimlingen gelingt am besten mittels des Eisenhämatoxylinverfahrens nach Meves[4]).

In den im Lichtschutzstadium befindlichen Körpern sieht man Fäden und Kügelchen. Werden die Thalli dem intensiven Licht ausgesetzt, so treten die letzteren hervor, während die ersteren verschwinden.

Jodmeerwasser färbt in den im Lichtschutzstadium befindlichen Körpern die Fäden hell — die Kügelchen dunkelbraun bis schwarz. Süßes Wasser löst die Kügelchen schnell, den übrigen Körper unter Quellung langsam auf. Osmiumsäure färbt die ganze Masse der irisierenden Körper schwarz. Salpetersäure löst zuerst die Kügelchen, dann allmählich auch die inzwischen sich gelb färbenden Teile. Millons Reagens löst die tröpfchenartigen Einschlüsse schnell, den übrigen sich ziegelrot färbenden Körper allmählich auf.

Nach Behandlung mit Osmiumsäure, Jod, Sublimat und Alkohol werden die irisierenden Körper auch in süßem Wasser nicht mehr aufgelöst.

Die chemische Natur des unter dem Einfluß intensiven Lichts entstehenden Körpers ist nicht bekannt.

---

[1]) F. C. von Faber, Über die Organisation und Entwicklung der irisierenden Körper der Florideen, Zeitschr. f. Bot., 1913, V, S. 801.

[2]) Jodblättchen werden im Meerwasser so lange erwärmt, bis sich violette Dämpfe über dem Wasser bilden; das Wasser muß eine hellbraune Farbe besitzen.

[3]) Glyzerin und gesättigte wässerige Eosinlösung werden zu gleichen Teilen gemischt und Hämatoxylinlösung so lange tropfenweise zugesetzt, bis die Fluoreszenz des Eosins verschwunden ist; vor Gebrauch wird die Lösung filtriert.

[4]) Meves, Arch. f. mikrosk. Anatomie und Entwicklungsgeschichte, 1907, LXX.

Furfuroide Membranstoffe

Als furfuroide Membranstoffe seien solche bezeichnet, die ohne Pentosane zu sein, beim Erhitzen mit Säuren wie jene Furfurol liefern. Dazu gehören diejenigen Membranstoffe, die durch Hydrolyse Glykuronsäure und Galakturonsäure liefern. Sie geben die Naphthoresorzinreaktion. Erhitzt man sie mit 20proz. Salzsäure und einer weingeistigen Lösung von Naphthoresorzin und schüttelt nach dem Erkalten mit Äther aus, so färbt sich dieser blau oder violett und zeigt ein Absorptionsband in D.

Nachdem Untersuchungen von Schwalbe, sowie Hägglund und Klingstedt es wahrscheinlich gemacht hatten, daß das aus Membranen durch Salzsäure entstehende Furfurol nicht ausschließlich den Pentosanen entstammt, konnten Schwalbe und Feldtmann[1]) durch Hydrolyse von Getreidestroh Glykuronsäure gewinnen.

E. Schmidt[2]) und seine Mitarbeiter vertreten die Auffassung, daß Glykuronsäure am Aufbau der Skelettsubstanz beteiligt ist, während die Galakturonsäure die Bindung von Hemizellulosen mit dem von Chlordioxyd (s. S. 895) angreifbaren Membran-Bestandteil vermittelt.

Aus Fucus serratus haben dann Schmidt und Vocke[3]) Polyglykuronsäure (Algin- oder Fucinsäure früherer Autoren) hergestellt.

In den Braunkohlen wies Marcusson[4]) gepaarte Glykuronsäuren nach. Weiterhin wiesen Schmidt, Meinel und Zintl[5]) Glykuronsäure als Teilstück eines karboxyltragenden Polysaccharids in den Skelettsubstanzen mehrerer Pflanzen nach.

Komatsu und Sasaoka stellten Glykuronsäure in wässerigen Auszügen von Bambusschößlingen fest.

Eine wahrscheinlich zu den Furfuroiden[6]) gehörende Substanz der Primärlamelle in den Zellwänden des Bambushalmes färbt sich mit weingeistiger Phloroglucin-Salzsäure in 1—2 Tagen rotviolett[7]).

Die Reaktion auf die Primärlamellensubstanz wird so ausgeführt, daß das Zellwandmaterial zunächst mit der weingeistigen Phloroglucin-Salzsäure unter Lichtausschluß 24—48 Stunden stehenbleibt

---

[1]) C. G. Schwalbe und G. A. Feldtmann, Über ein Vorkommen der d-Glucuronsäure in pflanzlichen Faserstoffen, Ber. deutsch. chem. Ges., 1925, LVIII, S. 1534.

[2]) E. Schmidt, W. Haag und L. Sperling, Zur Kenntnis pflanzlicher Inkrusten (VI), ebenda, S. 1394.

[3]) E. Schmidt und F. Vocke, Zur Kenntnis der Polyglykuronsäuren (I), ebenda, 1926, LIX, S. 1585.

[4]) J. Marcusson, Der chemische Aufbau der Braunkohlen, Zeitschr. angew. Chem., 1927, XL, S. 1114.

[5]) E. Schmidt, K. Meinel und E. Zintl, Zur Kenntnis der pflanzlichen Zellmembran, Ber. deutsch. chem. Ges., 1927, LX, S. 503.

[6]) E. Hägglund, Holzchemie (Leipzig 1928), S. 73.

[7]) M. Lüdtke, Annal. Chem., 466, 32 und 55 (1928).

Nach dem Abgießen der dunklen Lösung und Zugabe von etwa dem gleichen Raumteil Wasser zu dem Rückstand erkennt man bei bejahender Reaktion eine rotviolette Anfärbung der Faser, die um so violetter ist, je länger das Reagens mit der Faser in Berührung bleibt. Wässerige Phloroglucin-Salzsäure färbt unter gleichen Bedingungen die Faser mit intakter Primärlamelle nur gelb.

Da auch die Naphthoresorzinreaktion (s. S. 963) positiv ist, so handelt es sich wahrscheinlich um ein Uronsäureanhydrid.

Die Sporenpollenine

Die Sporenpollenine (Zetzsche) bilden das Exosporium der Sporen und Pollen, während das Endosporium aus Zellulose besteht. Sie werden durch verdünnte Mineralsäuren nicht, durch konzentrierte wenig angegriffen; Alkalien verändern sie erst in der Schmelze. Auch gegen Erwärmen sind sie sehr widerstandsfähig. Sie verfärben sich bei 280° und gehen bei 360° in eine schwarze pechartige Masse über. Die mit Säuren und Alkalien eintretenden Färbungen werden durch die Farbstoffe der Membranen beeinflußt. Die mit weingeistiger Ferrichloridlösung bei frischen Lycopodiumsporen auftretende blaugrüne Färbung konnte Zetzsche auf einen Gehalt an Hydrokaffeesäure zurückführen.

Konzentrierte Schwefel- oder Phosphorsäure verfärben sämtliche Sporenpollenine nach dunkel- bis schwarzbraun.

Die Sporenpollenine sind hochmolekulare sauerstoffhaltige, den Terpenen oder dem Kautschuk verwandte Stoffe.

Gehalt einiger Pollen an Sporopollenin und Zellulose nach Zetzsche.

	Zellulose %	Sporopollenin %
Lycopodium clavatum	2,3	23,8
Pinus silvestris . . .	2,0	21,9
Picea orientalis . . .	2,2	20,0
Corylus avellana . . .	1,1	7,3
Papaver	0,6	5,0
Phoenix dactylifera .	0,6	4,3

Die Membrane der Pilzsporen gehören nicht zum Terpentypus wie die Sporenpollenine. Sie sind gegen Alkalien und Säuren weniger resistent wie diese, enthalten keine Zellulosemembran, auch kein Cutin oder Suberin. Auch mit Chitin ist die Membransubstanz nicht identisch (Zetzsche).

Gummi

Als Pflanzengummi fassen wir klebrige, fadenziehende Polysaccharide zusammen, die ganz überwiegend der Membran entstammen. Es sind Körpergemische, die neben anorganischen Substanzen (Kalzium, Magnesium, Kalium u. a.) und Enzymen hauptsächlich aus Polysacchariden bestehen. Denn die Gummi liefern bei der Hydrolyse meist neben Methylpentosen Galaktose und Arabinose. Auch Uronsäuren können auftreten. Von einer ganzen Anzahl Gummiarten liegen Analysenbefunde vor. Doch muß bemerkt werden, daß die diesen Analysen zugrunde liegenden Gummi in ihren physikalischen und zum Teil in ihren chemischen Eigenschaften nicht völlig mit den im Gewebe auftretenden Gummimassen übereinstimmen.

Die Ansichten über die Gummibildung stimmen nicht überein. Nach vielen Autoren (u. a. Wigand [Lit. S. 948, 4], Moeller)[1]) setzt die Gummibildung in der primären Membran ein und schreitet von außen nach innen fort, nach Grüss (Lit. S. 686, 1) wird die sekundäre Membran hydrolytisch in Gummi übergeführt, welches die tertiäre Membran durchbricht und sich im Zellumen ansammelt. Tschirch (Anat. S. 196 u. 210) sagt: „Die Vergummung scheint hier (Amygdalaceen) von der mittleren Membran auszugehen“, aber beim Kirschgummi „zuerst wird die primäre Membran und zuletzt werden die inneren Schichten von außen nach innen aufgelöst“. Nach Mikosch (Lit. S. 388, 1) beginnt die Bildung beim Kirschgummi jedoch „stets in den Verdickungsschichten und schreitet von hier nach außen hin fort; zuletzt werden die primären Membranen gelöst“. Bromeliaceengummi entsteht ausschließlich in der Mittellamelle (Boresch)[2]). Lutz[3]) schließt sich der Ansicht von Mohls[4]) über die Bildung des Tragants aus den Membranen des Markes und der Markstrahlen an. Nach Butler[5]) beginnt bei Prunus und Citrus die Gummosis in den sekundären Lamellen und greift dann in die primäre Membran über. Den Gummifluß bei Steinobstbäumen hat Linsbauer (Verh. d. öst. Obstb.- u. pom. Ges., 1911) verfolgt. — Jedenfalls setzt die Gummibildung in der Membran ein und erhält die Bildungsstoffe aus dem Zellinhalte[6]). Wie bei den Schleimen wird man eine Gummibildung aus primärer und aus sekundärer Membran unterscheiden können; doch läßt sich hier die

---

[1]) J. Moeller, Acaciengum., Sitzgsber. Wien. Akad., 1875, LXXII,$_1$, 219.

[2]) K. Boresch, Über Gummifluß bei Bromeliaceen, nebst Beitr. zu ihrer Anatom., Sitzgsber. Wien. Akad., 1908, CXIII, S. 1033.

[3]) L. Lutz, Sur la mode de formation de la gomme adraganta, Bull. Soc. bot. France, 1910, LVII, S. 250.

[4]) H. v. Mohl, Entstehungsweise des Tragant, Bot. Ztg., 1857, XIV, S. 36.

[5]) O. Butler, A study on gummosis of Prunus and Citrus usw., Ann. of Bot., 1911, XXV, S. 107.

[6]) Zu den bei der Gummibildung benutzten Zellstoffen zählt Stärke; letztere läßt beim Kirschgummi enzymatische Einwirkung erkennen (mit Jod rotbraun), bei Bromeliaceen nicht (mit Jod nur blau); vgl. außerdem F. v. Höhnel, Material, welches zur Bildung des arabischen Gummis in der Pflanze dient, Ber. d. bot. Ges., 1888, und J. Wiesner, Chem. Ztg., 1906 u. a.

Genese nicht zur Einteilung benutzen, da beide Entstehungsweisen oft gleichzeitig erfolgen (Fig. 186).

Die Gummosis wird von vielen Forschern als ein pathologischer Vorgang angesprochen, der auf Wundreizen (mechanische Verletzungen, Tiere, Mikroorganismen, Smith, Ruhland, Ber. d. bot. Ges., 1907, XXV, S. 302 u. a.) und auf enzymatischen Prozessen (auch Beijerinck, Rant, Rech. s. l. nécrobiose, Corbeil, 1905) beruht. Doch kommt normalerweise in nicht verletzten Organen Gummi vor (Gummigänge, im jungen Frühjahrsholz, Grüss). Nicht alles Gummi ist nutzloses Sekret. Nach Grüss verläuft bei der Gummosis ein normaler Vorgang nur „übernormal". Zur Wundheilung scheint Gummi nicht in gleicher Weise wie Harz zu dienen. „Die verschiedenen Bromeliaceen zugefügten Stichwunden heilten durch Korkbildung aus" (Boresch).

Fig. 186. Prunus, Gummibildung in den Zellkappen eines Interzellularraumes; mit Benutzung einer Zeichnung von Mikosch und Iltis

Die Gummosis in den Früchten der Amygdalaceen betrachtet Beijerinck[1]) als zu ihrem normalen Entwicklungsgang gehörig, aber durch Wundreiz herbeigeführt.

Der vornehmste Herd der nach Verletzung entstehenden Gummibildung der Amygdalaceen ist das aus dem Kambium entstehende noch nicht differenzierte Holz. Hier entsteht unter dem Einfluß des Wundreizes ein Netz von Gummikanälen rund um die Wunde. Wird der Wundreiz durch Parasitismus chronisch, dann wird es auch die Gummibildung. Der Wundreiz geht von den Zellen aus, die durch Verwundung oder den Parasitismus absterben. Gummosis ist Cytolyse, verursacht durch Nekrobiose.

Auch in den Früchten, in denen die Gummibildung normal ist, liegt ihr ein Wundreiz zugrunde, dessen Ursprung die starke Gewebespannung in dem Parenchym der Fruchtwand ist. Der Wundreiz ist hier ein normaler Entwicklungsfaktor.

Nach Sorauer[2]) dagegen ist die Gummosis eine auch ohne äußeren Anstoß (Wunde) auftretende physiologische Erkrankung. Sie ist ein Zustand lokaler Plethora, also eine Anhäufung protoplasmatischer Substanz, die infolge ihres großen Reichtums an hydrolysierenden Enzymen und dementsprechend deren Übergewicht über die Coagulasen nicht imstande ist, zur normalen Zellmembran umgewandelt zu werden.

Gummibildung erfolgt in vielen Familien (Amygdalaceen, Leguminosen,

---

[1]) Beijerinck, Gummosis in de Amandel- en Perzikamandelvrucht als normaal *ontwikkelingsverschijnsel*, *Verlag van de gewone Vergaderingen der* wis- en natuurkundije afdeeling. Kon. Akad. van Wetenschappen, Amsterdam 1914, XXIII, S. 53.

[2]) P. Sorauer, Neue Theorie des Gummiflusses, Zeitschr. f. Pflanzenkrankheiten, 1915, XXV, S. 71.

Bromeliaceen, Aurantiaceen, Combretaceen, Meliaceen, Sterculiaceen, Anacardiaceen, Araliaceen u. a.).

Gummi läßt sich derzeit nur dann mit einiger Sicherheit im Gewebe nachweisen, wenn durch den makrochemischen Befund die Anwesenheit von Gummi sichergestellt ist. Dies ist beim Gummifluß der Fall, bei dem größere Gummimassen auftreten und man an der Oberfläche der Pflanzenteile ausgetretenes Gummi antrifft. Bei geringen Gummimengen ist der Nachweis nicht einwandfrei zu erbringen, besonders ist eine Unterscheidung von Gummi, Pektinmassen und Schleimen ungemein schwierig. Bei einiger Vorsicht im Präparieren kann man lebendes Material anwenden. Die Schnittfläche wird von dem ausgeflossenen Gummi befreit, die ersten Schnitte werden verworfen. Unter den folgenden Schnitten finden sich meist einige brauchbare Präparate (Mikosch). Ob eine Übertragung der schmierigen Gummisubstanz auf andere Gewebe stattgefunden hat, läßt sich auf optischem Wege ermitteln. Ein allen Anforderungen genügendes Härtungsmittel ist nicht bekannt. Schwächerer als 50proz. Weingeist härtet nicht und stärkerer Weingeist macht das Material für das Schneiden zu spröde und bewirkt in zartwandigen Elementen „Rißbildungen und Schrumpfungen, die auch bei nachherigem Wasserzutritt nicht mehr rückgängig gemacht werden können". Bei längerem Liegen in Weingeist bildet Gummi zuweilen Wabenstrukturen (Bromeliaceen, Boresch, 1908). Brauchbar ist öfter Austrocknen des Materials. Kleinere Stücke werden bei mäßiger, langsam ansteigender Wärme getrocknet. Versuche mit Schleimhärtungsmitteln wären zu erproben. Die einzelnen Gummiarten werden naturgemäß verschiedene Härtungsmittel erfordern.

Bei Präparaten[1]) lebenden Materials dient das polarisierte Licht als brauchbares Hilfsmittel. Die Zellwände sind bekanntlich doppelbrechend, leuchten bei gekreuzten Nicols auf. Alle in Gummibildung begriffenen Wände haben diese Fähigkeit verloren, sind optisch isotrop (Astragalus creticus, Prunus, W. Hofmeister [Pflanzenzelle, S. 345], Mikosch). Liegt aber getrocknetes oder Weingeistmaterial vor, so werden die Gummimassen mehr oder weniger anisotrop und stimmen alsdann mit dem ebenfalls anisotropen Handelsgummi überein (Wiesner). Der diagnostische Wert der optischen Verhältnisse erfährt eine Einschränkung, denn nach Tunmanns Befunden zeigen viele in Schleimbildung sowie in Pektinmetamorphose befindlichen Wände das gleiche Verhalten. Im gewöhnlichen Lichte treten Gummimassen und

---

[1]) Von Kirschgummi lassen sich Halbdauerpräparate mit Rizinus-Alkohol (gleiche Teile) herstellen.

Gummimembranen hell hervor und heben sich von den normalen Zellwänden durch ihr Lichtbrechungsvermögen ab.

Ein Spezialreagens für sämtliche Gummiarten gibt es nicht und kann es bei der wechselnden Zusammensetzung des Gummis nicht geben. Dadurch sind ebenfalls die sich widersprechenden Befunde über Färbungen zu erklären.

In der Literatur finden sich Angaben über die Identifizierung von Gummibestandteilen die dadurch erfolgen soll, daß man zu Wasserpräparaten erst 20proz., dann allmählich stärkeren Weingeist hinzugibt und die bei jedem erneuten Zusatz eintretenden Veränderungen feststellt. Die Angaben seien der Vollständigkeit wegen wiedergegeben, obgleich sie von sehr zweifelhaftem Wert sind.

Arabin, der Hauptbestandteil des Gummi arabicums, der wasserlösliche Anteil mancher anderer Gummi, werde an der körnigen Fällung erkannt, die Weingeist, noch mehr angesäuerter Weingeist hervorruft und die bei Wasserzutritt wieder verschwindet (nach Mikosch soll Arabin im Zellinhalte auftreten). Cerasin zeige, wenn es in der Gummimasse überwiegt, bei Weingeistzusatz keine Trübung, sondern werde homogen kontrahiert und ist in Kalkwasser löslich (Mikosch fand es in- und außerhalb der Zellen). Bassorin ist wasserunlöslich und steht möglicherweise den Pektinen nahe. Chloralhydratlösungen (20—40proz.) werden sich ebenfalls diagnostisch verwerten lassen.

Auch Färbungen sind ein zweifelhaftes Hilfsmittel zur Unterscheidung verschiedener Gummibestandteile. Doch geben die gefärbten Präparate einen besseren Einblick. Mangin benutzte Rutheniumrot (s. Pektine). Lutz[1]) wendet ferner an: Neutralrot (2,25 Teile Casellarot in 20 Teilen Weingeist, 90proz., und 30 Teilen destilliertes Wasser) und Säuregrün (10 Teile in gleicher Lösung). Neutralrot färbt Gummi rosafarben und rot. Färbt man mit Säuregrün nach, so werden die Plasmakörper grünlichblau und die Membranen sollen nach Mikosch rotorange, nach Lutz grün werden. Hansteinsches Anilinviolett (S. 354) gab Tunmann bei Prunus stark rosenrote Färbung. Boresch färbt Bromeliaceengummi mit Anilinblau und Gentianaviolett.

Gummimembranen (Amygdalaceen) färben sich mit Chlorzinkjod gelb und geben, falls sie verholzt waren, Phloroglucinsalzsäurereaktion. Die braunen Gummimassen von Aechmea miniata var. discolor führen einen (mit Ferrosulfat grün werdenden) Gerbstoff. Das Gummi von Quesnelia roseo-marginata wird mit Jodjodkalium oder Jodwasser grün (Boresch).

Frank (Ber. bot. Ges., 1884, II, 321) gibt Gummikörnchen an, die sich nicht in Wasser (auch nicht in warmem), Weingeist, Äther, Kalilauge, Schwefelsäure lösen, Fuchsin speichern, Phloroglucinsäurereaktion geben und beim Kochen mit Salpetersäure Oxalsäure und Schleimsäure liefern.

---

[1]) L. Lutz, Sur la marche de la gommose dans les Acacias, Bull. Soc. Bot. de France, 1895, LII, S. 467.

Eine Gummimembran gibt Heinricher (Lit. S. 150, 3) in der Schwellschicht der Kapsel von Lathraea clandestina an (stark quellbar, unlöslich in Wasser und Alkohol, löslich in Eau de Javelle, nicht färbbar mit Kongorot, Corallinsoda und Jodreagentien). — Über die Bildung des Chagual-Gummi hat Hartwich berichtet (Zeitschr. öst. Ap. Ver., 1896, XL, 565), über Moringa-Gummi machten Jadin und Boucher Angaben (Bull. sc. pharm., 1908, S. 247).

Holzmembran

Die Membranen der meisten Hölzer unterscheiden sich von Zellulosemembranen dadurch, daß sie mit Chlorzinkjod nicht violett werden, dagegen eine Anzahl von Farbenreaktionen (z. B. Gelbfärbung mit Anilinsulfat-Salzsäure, Rotfärbung mit Phloroglucin-Salzsäure) geben. Membranen, welche dieses Verhalten zeigen, nennt man unabhängig vom Orte ihres Vorkommens verholzt. Verholzte Membranen enthalten außer Zellulose (u. event. anderen Membranstoffen) Lignin. Behandelt man verholzte Membranen mit 41proz. Salzsäure, so wird Zellulose unter Abbau zu Glykose herausgelöst und Lignin bleibt zurück (Willstätter). Auch mit Schweizerschem Reagens kann man die Zellulose herauslösen, doch manchmal ungenügend. Sulfitlauge oder Kaliumchlorat und Salpetersäure lösen Lignin, während die Zellulose zurückbleibt.

Verholzte Wände sind (im Gegensatz zur Zellulose) unlöslich in Kupferoxydammoniak, aber löslich in konzentrierter Chromsäure (wie Zellulose und Hemizellulosen und im Gegensatz zu Kork und Kutikula). In konzentrierter Schwefelsäure löst sich Holz schwer, meist erst nach längerer Zeit; sehr stark verholzte Wände sind unter Deckglas zuweilen unlöslich.

Die aromatischen Anteile des Holzes werden entfernt[1]), durch mehrtägige Mazeration mit Eau de Javelle, durch Kaliumchlorat-Salpetersäure und Bromwasser mit Nachbehandlung mit Ammoniak. Vorangehende Reinigung des Holzes mit verdünnter Salzsäure ist oft zweckmäßig. Derart behandelte Holzwände führen nur noch die Zellulose (Jodreaktion). Mit Eau de Javelle behandelte Holzwände speichern Metalle (Kupfer, Eisen, Blei, Nickel, Kobalt, Kadmium, nicht Quecksilber, Gold, Platin)[2]).

Die Beobachtung von Ritter, daß das Lignin der Zellwände sich

---

[1]) L. Mangin, S. l. reactifs jodés de la cellulose, Bull. Soc. bot. France, 1888, XXXV, 425. — A. Zimmermann, Mikrochem. Reaktion von Kork und Kutikula, Zeitschr. wiss. Mikr., 1892, IX, 63. — K. Kroemer, Wurzelhaut, Hypodermis, Endodermis, Diss., Marburg 1903, S. 8.

[2]) M. Devaux, Généralité d. l. fixation d. métaux p. l. paroi cell., Soc. Linn. de Bordeaux 1901.

bei einer Reihe von Hölzern von dem der Mittellamellen unterscheidet, erklärt sich nach Harlow[1]) durch Mischung mit Zellulose.

„Holz scheint aus ligninarmen zellulosereichen Teilen zu bestehen, die in Kupferoxydammoniak gehen und aus zelluloseärmeren ligninreicheren, die zurück bleiben. Es wird sich aber nicht einfach um zwei Komponenten handeln" (Ungar).

Die Trennung des Lignins von der Zellulose kann auch mit Chlor erfolgen (Cross und Bevån). Man geht am besten so vor, daß man nach erstmaliger Einwirkung des Chlors das entstandene „Ligninchlorid" mit Natriumsulfitlösung auswäscht und so lange weiter chloriert, bis mit Natriumsulfit kein Ligninchlorid mehr nachzuweisen ist, d. h. keine Braunrotfärbung mehr eintritt.

Die Sekundärwände der Coniferen sind im Gegensatz zu denen der Angiospermen stark verholzt. Ihr Lignin kann durch Chlorwasser entfernt werden, ohne daß die Mittellamelle angegriffen wird.

Das Lignin kann man ferner herauslösen, wenn man Phenol bei Temperaturen von 200° und darüber einwirken läßt (Bühler, Ungar).

Den Ligninanteil des Holzes kann Friese[2]) in wasserlöslicher Form dadurch von den übrigen Bestandteilen des Holzes abtrennen, daß er Holzmehl mit einer 9—10 Vol.-% Schwefelsäure enthaltenden Mischung gleicher Teile Essigsäureanhydrid und Eisessig behandelt, nach einigen Tagen mit der 1½—2fachen Menge Chloroform verdünnt und dann mit Wasser ausschüttelt.

Wichtig ist die Feststellung von Alexandrov und Djaparidze[3]), daß verholzte Zellwandungen, z. B. die Sklereiden der Quitte, unter gewissen Bedingungen wieder in den Zellulosezustand zurückkehren können. Die Entholzung ist bei lebenden und toten Zellen ein weitverbreiteter Vorgang.

Die Angabe von Schilling[4]), daß die Verholzung bei Zellen von Linum usitatissimum und Cannabis sativa reversibel sei, konnte durch Jaeger[5]) nicht bestätigt werden.

---

[1]) W. M. Harlow, Lignification in the secondary and tertiary layers of the cell walls of wood, Bull. N. J. State Coll. Forestry Syracuse, 1928, I, S. 12; Ref. in Bot. Zentralbl., 1929, CLVI, S. 209.

[2]) H. Friese, Über die wasserlöslichen Abbauprodukte des Lignins (II. Mitt.), Ber. deutsch. chem. Ges., 1930, LXIII, S. 1902.

[3]) W. G. Alexandrov und L. J. Djaparidze, Über das Entholzen und Verholzen der Zellhaut, Planta, 1927, IV, S. 466. — W. G. Alexandrov und O. G. Alexandrova, Ist die Verholzung ein reversibler oder irreversibler Vorgang?, Planta, 1929, VII, S. 340.

[4]) E. Schilling, Ein Beitrag zur Physiologie der Verholzung und des Wundreizes, Jahrb. f. wiss. Bot., 1923, LXII, S. 528.

[5]) M. Jaeger, Untersuchungen über die Frage des Wachstums und der Entholzung verholzter Zellen, Jahrb. f. wiss. Bot., 1928, LXVIII, S. 345.

Dagegen beobachtete K. Kaufmann (l. c. 974, 2), daß die Phloroglucinreaktion bei den Schließzellenmembranen junger noch eingerollter Blätter einiger Gramineen positiv, bei den Schließzellen der älteren entfalteten Blätter sehr schwach, meistens negativ ist und schließt daraus, daß mit zunehmendem Blattalter ein Abbau des Coniferins stattfindet.

Kleine lichtbrechende Kügelchen fand Heinricher (Lit. S. 150, 3) in lebenden Zellen der Haustorialköpfe von Lathraea, die sich bei Weingeistzusatz zu größeren vereinen und ihre Lichtbrechung einbüßen, mit Jodreagentien gelbbraun werden, in Äther unlöslich sind. Die nach der Behandlung mit Eau de Javelle zurückbleibenden Tröpfchen färben sich wie verholzte Membranen mit Fuchsin. Es soll eine aus den verholzten Membranen der Wirtpflanze stammende Substanz gummiartiger Natur vorliegen. Ligninkörper gibt Hartwich (Lit. S. 387 1) in der Nahrungsschicht der Infectoriagalle an; es sind cystolithenartige Wucherungen der Zellwände, die auch bei anderen Gallen auftreten (Küstenmacher, Lit. S. 379, 2).

Lignin ist der in allen Lösungsmitteln unlösliche, nicht hydrolysierbare Bestandteil verholzter pflanzlicher Gewebe (Rassow und Zickmann)[1].

Reines Willstätter-Lignin reagiert mit den üblichen Verholzungsreagentien entweder überhaupt nicht oder doch nur sehr schwach, so daß sie keine spezifischen Ligninreagentien sind. Als spezifische Ligninreaktionen sind zu betrachten: 1. Färbungen, mit konzentrierten Mineralsäuren (grüne unbeständige Zwischenfarben, schwarze Endfärbung), sie beruhen auf Salzbildung; 2. Gelbfärbung mit Chlor, beruhend auf der Bildung von Chlorlignin, löslich mit rotbrauner Farbe in Alkalien, Ammoniak, Natriumsulfit und Weingeist, dazu die Reaktionen von Cross und Bevan, sowie von Mäule; 3. Blaufärbung mit Ferriferricyanid, beruhend auf der leichten Oxydierbarkeit des Lignins.

Die von Freudenberg, Zocher und Dürr hergestellten Ligninskelette aus Fichtenholz weisen Stäbchendoppelbrechung auf. Diese Form-Anisotropie verschwindet in Jodbenzol (n = 1,62), während sie in tiefer und höher brechenden Flüssigkeiten positiv ist. „Es ist somit einwandfrei bewiesen, daß das Lignin keine Eigendoppelbrechung besitzt und intermicellar zwischen die kristallinen Zelluloseteilchen eingelagert ist" (Frey-Wyssling).

Die chemische Arbeit am Lignin ist z. Z. in vollem Fluß, so daß ein endgültiges Urteil über seine chemische Zusammensetzung nicht angegeben werden kann. Nach Freudenberg und seinen Mitarbeitern liegt dem Lignin vielleicht eine Kette zugrunde, die man sich aus 1 Mol. Piperonylglyzerin und 11 Mol. Vanillylglyzerin unter Austritt von Wasser entstanden denken kann. Fuchs (Ber. deutsch. chem. Ges., 1928, LXI, S. 2197) glaubt, einen Tetrahydrobenzol-

[1]) B. Rassow und P. Zickmann, Über das Willstätter-Lignin, Journ. prakt. Chem., 1929, CXXIII, S. 189.

ring nachgewiesen zu haben. Ein hydrierter Benzolring kommt auch in der Formel von Jonas (Papierfabrikant, 1928, XXVI, S. 221 und Ber. deutsch. chem. Ges., 1929, LXII, S. 1554) vor. Vgl. dazu P. Klason, Ber. deutsch. chem. Ges., 1930, LXIII, S. 792.

Als die Ligninsubstanz betrachtet Grüß[1]) einen Alkohol (Ligninalkohol) F. 160°, der außer der Phloroglucin-Salzsäurereaktion viele andere Farbenreaktionen gibt, als charakteristischste die folgende: Die absolut-alkoholische Lösung von einigen Milligramm Ligninalkohol und der doppelten Menge Brenzkatechin wird mit Salzsäure angesäuert auf konzentrierte Schwefelsäure geschichtet. An der Berührungsfläche erscheint eine braunviolette in Amethystviolett übergehende Färbung.

Die Gegenwart einer Piperonylkomponente wird von manchen Autoren (Hägglund und Urban, Fuchs und Horn) bestritten.

Das früher von Czapek als Träger der Reaktion betrachtete Hadromal erwies sich als ein Gemisch, in dem Coniferylaldehyd fehlt (Grafe, Monatshefte f. Chem., 1904, XXV, S. 987; H. Pauly und K. Feuerstein, Ber. deutsch. chem. Ges., 1929, LXII, S. 298).

Durch Vakuumdestillation des Lignins erhielten Rassow und Zickman außer Guajakol, Kreosol und dessen Homologen Eugenol. Es sind also höhere Phenole am Aufbau des Lignins beteiligt. Kalischmelze unter Zusatz von Zinkstaub liefert bis 15% kristallinische Protokatechusäure. Am besten entspricht es nach den genannten Verfassern allen Tatsachen, wenn man das Lignin als ein Polymeres (mit der wenig abzuändernden Klasonschen Formel) des α-Lignins betrachtet.

```
                                              CH = CH CHO
  H3CO · C         O            H             |
                                C             C
  H2C                   C ···  C              CH
                                C             C · OCH3
  H2C                   COH
                                O
         C         C
         H2        O            CO CH3
```

v. Wacek[2]), der durch Abbau von Methyllignin eine 3,5-Dimethoxybenzoesäure erhielt, nimmt die O-Atome in Pyrogallolstellung und im Lignin folgenden

```
                     OCH3
                      ·
aromatischen Rest —O·⟨  ⟩·C— an.
                      ·
                     —O
```

[1]) J. Grüß, Über die Ligninsubstanz, Ber. deutsch. bot. Ges., 1924, XLI, S. 48.

[2]) A. v. Wacek, Über Methylierung von Buchenholz und Spaltung des Methylbuchenholzes; Untersuchung des Buchenholzlignins, Ber. deutsch. chem. Ges., 1930, LXIII, S. 282.

Über eine Theorie der Ligninbildung s. W. Fuchs, Biochem. Zeitschr., 1927, CLXXX, S. 30.

Ehrlich[1]) denkt an eine enzymatische Umwandlung von Pektin in Lignin.

Über die Abhängigkeit der Lignin- und Xylembildung von äußeren Faktoren siehe die gleichbetitelte Dissertation von Bertha Zinn (Basel 1930).

Alle neueren Untersuchungen (Heß und Mitarbeiter) sprechen dafür, daß das Lignin mit den anderen Kohlenhydraten der Zellwand weder chemisch verbunden noch homogen gemischt ist.

Nach der Auffassung von Freudenberg, Zocher und Dürr[2]) durchsetzt das Lignin die Membran wie ein Netzwerk, das bestehen bleibt, selbst wenn nahezu drei Viertel der Gewebesubstanz entfernt sind. Das Netzwerk selbst denken sie sich wie etwa folgendes Modell: Bleistäbe von Bleistiftdicke und allen Längen bis zu mehreren Dezimetern werden möglichst unregelmäßig verbogen, sowie an einer oder mehreren willkürlich gewählten Stellen in größter Unordnung miteinander verlötet. So entsteht ein dreidimensionales Gebilde von großer innerer Oberfläche und erheblicher Starrheit.

Die Umschließung der Zelluloseschichten durch ein Hautsystem beweist, daß die Zellulose mit dem Lignin und den anderen Membranstoffen in der Zellwand chemisch nicht verknüpft sein kann. Allgemein steht beim Aufbau der Zellmembran mit der Schichtung eine stoffliche Differenzierung in engem Zusammenhang (Heß)[3]).

Daraus, daß die Doppelbrechung der verholzten Membran dieselbe ist, wie die der unverholzten, schließt Frey[4]), daß das Lignin amorph zwischen die doppelbrechende Zellulosemicelle eingelagert wird (s. a. oben).

Im Lignin, das demnach nicht als einheitlicher Stoff aufzufassen ist, kann man nach Wislicenus[5]) drei Gruppen von Stoffen unterscheiden, die alle kolloide Beschaffenheit und kolloide Löslichkeit oder Quellbarkeit besitzen: a) kolloide Polysaccharide (Pentosane, Hexosane, Hemizellulose, Holzgummi); b) kolloide Kalziumsalze von Pektinsäuren und anderen hochmolekularen Pflanzensäuren; c) kolloide Derivate der Polyoxybenzole und des Cymols.

Das Holz ist nach demselben Forscher hauptsächlich das Ergebnis einer Kolloid-Adsorptionssynthese. Das Adsorbens ist der bis zum „mizellaren"

---

[1]) F. Ehrlich, Über die Chemie des Pektins und seine Beziehungen zur Bildung der Inkrusten der Zellulose, Zeitschr. angew. Chem., 1930, XLIII, S. 177.

[2]) K. Freudenberg, H. Zocher und W. Dürr, Weitere Versuche über Lignin, Ber. deutsch. chem. Ges., 1929, LXII, S. 1814; vgl. dazu P. Klason, Beiträge zur Konstitution des Fichtenholzlignins, ebenda, S. 2523.

[3]) K. Heß, Zur Frage des Aufbaues pflanzlicher Membrane, Biochem. Zeitschr., 1928, CCIII, S. 409.

[4]) A. Frey, Über die Intermicellarräume der Zellmembranen, Ber. deutsch. bot. Ges., 1928, XLVI, S. 444.

[5]) H. Wislicenus, Der kolloid-chemische Aufbau des Holzes, Die Naturwissensch., 1930, XVIII, S. 387; daselbst Literaturangaben über die Arbeiten von Wislicenus.

Zustand dispergierte Zellstoff, die ursprünglich hochgradig starrdisperse Membran- und Faserzellulose oder die „Skelettsubstanz“ (E. Schmidt). „Das Adsorbendum besteht aus den oben erwähnten, im Cambialsaft aufgebauten, vorwiegend kolloidgelösten, hochmolekularen Ligninbestandteilen. Das Lignin oder die holzbildende ‚inkrustierende‘ Substanz ist also die Summe aller aus dem Hydrosol des Cambialsaftes auf dem Oberflächenkörper der Zell- und Fasermembrane zunächst durch Adsorption niedergeschlagenen kolloiden Baustoffe.“

Über die quantitative Zusammensetzung des Lignins in verschiedenen Pflanzen s. P. Klason, Ber. deutsch. chem. Ges., 1930, LXIII, S. 1548.

Über die physiologische Bedeutung der Verholzung sind die Ansichten geteilt. Nach Sachs bewirkt die Verholzung „Steigerung der Härte der Zellhaut, Verminderung ihrer Dehnbarkeit, leichte Durchdringlichkeit für Wasser ohne bedeutende Aufquellung“. Sonntag sagt, daß verholzte Membranen „eine große Duktilität zeigen, sie sind imstande, auch über die Elastizitätsgrenze hinaus auf sie wirkenden Kräften nachzugeben“, Schellenberg, „daß die verholzte Membran nicht mehr wachstumsfähig sein möchte“ (wird von Nathansohn, Jahrb. wiss. Bot., 1898, XXXII, 671, verneint). Die mechanischen Eigenschaften einer Membran werden nach Ansicht mancher Forscher durch die Verholzung nicht verändert[1]).

Andererseits wird aber auch die Ansicht vertreten, daß Lignin als Bestandteil der Mittellamelle im verholzten Gewebe eine Kittsubstanz darstelle, welche die Gerüstzellulose starr und fest mache.

Die Transpirationsgrößen verholzter und unverholzter Membranen unterscheiden sich nicht so bedeutend, wie die der Epidermis- und Schließzellen bei stark transpirierenden Pflanzen (K. Kaufmann)[2]).

Neuerdings neigt man dazu, das durch die Verholzung bedingte hohe Wasserbindungsvermögen der verholzten Membran in den Vordergrund zu stellen (Casparis, Porsch)[3]). Sie sichert die von der Kohäsionstheorie für die ungestörte Wasserleitung auf weitere Strecken verlangte „Kontinuität‘ der Adhäsion der Wasserfäden“ und ermöglicht, da sie für in Wasser gelöste Gase durchlässig ist, den an die Gefäße angrenzenden lebenden Mantelzellen die Aufnahme von Sauerstoff aus den in den Gefäßen befindlichen Flüssigkeit.

Verholzte Membranen sind stärker lichtbrechend als die reinen Zellulosemembranen und leuchten im polarisierten Lichte auf, starke Wände zeigen hierbei ein dunkles Kreuz. Sie sind mehr oder weniger

---

[1]) J. Sachs, Lehrb. d. Bot., IV, Auf., 21. — P. Sonntag, Die Beziehungen zwischen Verholzung, Festigkeit und Elastizität veg. Zellwände, Landw. Jahrb. (H. Thiel), 1892. — H. C. Schellenberg, Beitr. z. Kenntn. d. verholzt. Zellmembran, Jahrb. d. wiss. Bot., 1896, XXIX, 237. — Warburg, Ber. bot. Ges., 1893, XI, 425.

[2]) K. Kaufmann, Anatomie und Physiologie der Spaltöffnungsapparate mit verholzten Schließzellmembranen, Inaug.-Diss. Münster 1927 und Planta 1927, III, S. 27.

[3]) O. Porsch, Zur physiologischen Bedeutung der Verholzung, Ber. deutsch. bot. Ges., 1926, XLIV, S. 137.

gelb. Bei ultramikroskopischer Betrachtung zeigen sie annähernd parallele Reihen stark leuchtender und großer Micellen, zwischen denen sich optisch leere Reihen finden (Gaidukov, Lit. S. 711).

Verholzte, kutinisierte und verkorkte Zellwände reagieren sauer, pektinhaltige Zellulosewände neutral bis schwach alkalisch. Armstrong fand (mit Diäthylrot und Methylrot) für verholzte Zellwände p_h 4,0 bis $< 3,4$, für verkorkte $p_h < 3,4$ und für kutinisierte p_h 5,2 bis 4,8—4,0.

Als verholzt wurde früher jede Membran angesprochen, die mit Jodreagentien keine Zellulosereaktion gab und sich mit Kalilauge gelb färbte. Auch Chlorzinkjod (jetzt noch zuweilen benutzt, gelb) ist kein Verholzungsreagens, da es in gleicher Weise mit Hemizellulosen und Pektinen reagiert. Schon 1834 fand Runge (Pogg. Ann., XXXI, 65), daß ein Holzspan mit Phenolsalzsäure bei Belichtung blaugrün wird. Die Reaktion führten Tiemann und Haarmann (Ber. chem. Ges., 1874, VII, 608) auf Coniferin zurück.

Die beiden Hauptgruppen der Verholzungsreagentien sind die der aromatischen Amine und der Phenole. Beide Reaktionen werden von vielen Autoren auf die Gegenwart einer Aldehyd-(Karbonyl-) Gruppe zurückgeführt. Als Stütze für diese Anschauung wird angegeben, daß die meisten Holzreaktionen ausbleiben, wenn das Holz mit Oxydationsmitteln, z. B. Benzopersäure behandelt oder Stoffen, wie Hydroxylamin und Natriumbisulfit ausgesetzt wurde, die sich mit Aldehyden verbinden[1]).

Unter den aromatischen Aminen ist das Anilin, das zuerst angewandt wurde, auch jetzt noch das zumeist angewandte.

Anilinsulfat wurde, anknüpfend an die Befunde Schapringers, von Wiesner[2]) eingeführt. Die Schnitte werden auf dem Objektträger in Anilinsulfat gelegt ((1 Anilinsulfat, 70 Wasser, 30 Weingeist, 3 Schwefelsäure). In gleicher Weise läßt sich salzsaures Anilin[3]) benutzen. Der Säurezusatz verstärkt die Färbung (gelb), die sich in Dauerpräparaten hält. Da aber Oxalate von den Säuren nach längerer Zeit angegriffen werden, so ist für Dauerpräparate eine Lösung von 2 ccm Anilin, 4 ccm Essigsäure und 194 ccm 50proz. Weingeist anzuraten[4]). Bei an sich stark gelb gefärbten Membranen tritt die Reaktion nicht augenfällig in Erscheinung.

---

[1]) E. Ungar, Beiträge zur Kenntnis der verholzten Faser, Diss. Eidgen. techn. Hochschule Zürich, 1914 (Budapest 1916).

[2]) Schapringer, Dingl. polyt. Journ., 1865, CLXXVI, 166 und J. Wiesner, Karstens bot. Unt., 1886, I, 200.

[3]) F. v. Höhnel, Kork und verkorkte Gewebe, Sitzgsber. Wien. Akad., 1865, LXXXVII, S. 507.

[4]) A. Falck, Simarubarinde, Arch. d. Pharm., 1912, CCL, S. 45.

Gelbe Färbungen geben: Diphenylamin (Ellram, Lit. S. 136, 3), Lepidin (Ihl), α- und β-Naphthylamin (Nickel, Lit. S. 290, 2), Paratoluidin (Singer, Sitzgsber. Wien. Akad., 1882, LXXXV, 345), Metaphenylendiamin (Molisch, Verh. zool. bot. Ges., Wien, 1887, 30) u. a.

Orange Färbungen geben: Toluylendiamin (R. Hegler, Flora, 1890, LXXIII, 31, konzentrierte wässerige Lösung + Salzsäure, färbt stärker als Anilinsulfat, haltbar in Gelatine, Schnitte zuvor gut mit Fließpapier abtrocknen), Thallinsulfat (konzentrierte Lösung [Wasser + Weingeist, 1 + 1], färbt haltbar ohne Säure, wichtig für oxalatführende Dauerpräparate).

Unter den Phenolen steht geschichtlich das Phenol par excellence (Runge 1834) und nach der Häufigkeit der Anwendung das Phloroglucin an der Spitze.

v. Höhnel[1]) fand, daß Kirschholzextraktlösung mit Salzsäure kräftig rotviolett färbt und nannte die wirksame Substanz Xylophilin. Wiesner[2]) zeigte aber, daß ein Gemisch von Phloroglucin und Brenzkatechin vorliegt und führte die Phloroglucinsalzsäurereaktion ein. Zur Ausführung der Reaktion ist es am besten, ein Kriställchen Phloroglucin auf dem Objektträger mit starker Salzsäure zu verreiben und den Schnitt in die Lösung zu bringen. Verholzte Membranen werden violettrot. In Dauerpräparaten ist die Färbung nicht haltbar, sie verblaßt und wird gelblich.

Das Ausbleiben der Phloroglucin-Salzsäurefärbung ist nach van Wisselingh[3]) kein Beweis für das Fehlen von Verholzung. So geben dickwandige Holzelemente, Holzfasern und Gefäße, wenn sie in Glyzerin auf 300° erhitzt waren, keine Phloroglucin-Salzsäurereaktion mehr, werden aber durch Fuchsin, Bayers Blau extra grünlich in essigsaurer Lösung und ammoniakalische Lösung von Rutheniumrot gefärbt.

Verholzte Membranen geben nach Behandlung mit Javellescher Lauge die Phloroglucin-Salzsäurereaktion nicht mehr, wohl aber die Blaufärbung mit Chlorzinkjod, färben sich aber nicht mit Farbstoffen, die als spezifisch für Zellulose gelten, während reine Zellulosemembranen dies auch nach der Behandlung mit Javellescher Lauge tun (Kisser)[4]). Zusatz von Weingeist zur Phloroglucinsalzsäure, wie er früher vielfach

---

[1]) F. v. Höhnel, Histochemische Untersuchungen über das Xylophilin und das Coniferin, Sitzgsber. Wien. Akad., 1877, LXXVII,$_1$, 527.

[2]) J. Wiesner, Note über das Verhalten des Phloroglucins und einiger verwandter Körper zur verholzten Zellmembran, Sitzber. Wien. Akad., 1878, LXXVII,$_1$, 60.

[3]) C. van Wisselingh, Beitrag zur Kenntnis der inneren Endodermis, Planta 1926, II, S. 27.

[4]) J. Kisser, Ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der Becherschen Färbungen, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1924, XLII, S. 82.

empfohlen wurde, kann zu Täuschungen infolge der Anwesenheit von Furfuroiden (s. S. 963) führen. Auch kann, da der Farbstoff in Weingeist löslich ist, er in nicht reagierende Schichten der Membran diffundieren (Lüdtke)[1].

Die Phloroglucinsalzsäure wird wohl am meisten benutzt[2]. Die Reaktion ist empfindlich (färbt bereits sehr schwach verholzte Wände) und in der Ausführung die einfachste. Die Angabe Ihls, daß die Pyrrolreaktion (s. unten) empfindlicher sei, trifft nach Tunmanns Befunden nicht zu. Irrtümer können aber dort unterlaufen, wo harzige Sekrete bestimmte Körper führen (Ferulasäure, Vanillin), welche die Membranen (besonders sezernierender Zellen) imprägnieren (vgl. S. 326 oben). In diesen Fällen muß man die Schnitte zunächst vor Anstellen der Phloroglucin-Salzsäurereaktion gründlich mit Weingeist ausziehen und mit Wasser nachwaschen. Vgl. noch S. 963.

Später wurden weitere Reaktionen bekannt, die aber in vieler Beziehung der Phloroglucinsalzsäurereaktion nachstehen.

Rote, violette und **blauviolette** Färbungen geben folgende Reaktionen: Resorcin (Wiesner, alkoholische Lösung + Salzsäure, violett), Orcin (Ihl, Chem. Ztg., 1885, IX, 266, alkoholische Lösung + Salzsäure, dunkelrot).

Grüne bis **blaue** Färbungen geben: verschiedene Phenole in Verbindung mit Salzsäure. Auch Bromwasserstoffsäure färbt blaugrün (Grafe, Monatsh. Chem., 1904, 1029). Die Angabe H. Warneckes (Pharm. Ztg., 1888, XXXIII, 574), daß rauchende Salzsäure allein die Farben bedingt, trifft nicht für alle Hölzer zu, auch wird durch Phenol die Färbung verstärkt. Man benutzt: Phenol (v. Höhnel, konzentrierte wässerige Lösung, mit Kaliumchlorat gesättigt + Salzsäure). Pyrogallol (Wiesner), Kresol, Guajacol (Czapek, Zeitschr. physiol, Chem., 1899, XXVII, 141), Anisol, Anethol (Ihl), Naphthol, Thymol (Molisch, Ber. bot. Ges., 1886, V, 303, alkoholische Lösung + Kaliumchlorat + Salzsäure). — Auch Thiophen (Ihl) gibt Grünfärbung.

Zuweilen bewirkt Salzsäure allein eine schwach rötliche oder violette Färbung. In diesen Fällen enthalten die Zellen des Präparates phloroglucidische Körper, welche die Reaktion hervorrufen.

Verholzte Elemente färben sich mit starken Säuren (25proz. Salzsäure, 60proz. Schwefelsäure) rot, wenn sie sich mit Phloroglucinsalzsäure färben und wenn in dem Pflanzenteil auch die Vanillinsalzsäurereaktion bejahend ausfällt. In den Pflanzenteilen, bei denen die Vanillinsalzsäurereaktion negativ ausfällt, färben sich verholzte Elemente, die auch die Phloroglucinsalzsäurereaktion geben, mit starken Säuren grün

---

[1]) M. Lüdtke, Zur Kenntnis der pflanzlichen Zellmembran, Liebigs Annal., 1928, CCCCLXVI, S. 27.

[2]) B. Korn, Untersuchungen über technisch-mikroskopische Unterscheidungen einiger Fasern, insbesondere der Leinen- und Hanffaser, Diss. Dresden 1910.

(Lortz)[1]. Die mit Schwefelsäure eintretende Grünfärbung wurde zuerst von Linde beobachtet[2]. Teufer[3]) empfiehlt die Anwendung der 70proz. Säure.

Die schon von Senft[4]) beobachtete Reaktion des Phenylhydrazinhydrochlorids mit verholzten Elementen wird neuerdings so verwendet, daß man mit einer konzentrierten Lösung von Phenylhydrazinhydrochlorid in Eisessig erwärmt: Grünfärbung. Hatte man mit Phenylhydrazin gefärbt, so bedarf es erst längerer Einwirkung von Salzsäure, wenn dann die Reaktion mit Phloroglucinsalzsäure eintreten soll.

1901 beobachtete Mangin, daß verholzte Membranen durch Benzidin rotbraun gefärbt wurden. Schneider[5]) gibt 1914 an, daß eine mit Weingeist versetzte gesättigte Lösung des Benzidins in 1proz. Salz- oder Essigsäure verholzte Membranen gelb färbt. Fehér und Vági[6]) verwenden eine Lösung von 0,2 g Benzidin in einem Gemisch von 100 ccm Eisessig und 200 ccm Wasser. Sie belassen die Schnitte 2—3 Minuten in der Lösung, bis intensive Gelbfärbung eingetreten ist, waschen mit destilliertem Wasser aus und untersuchen in Wasser.

Schließlich wurde dieselbe Reaktion 1926 nochmals von Fourment und Roques „entdeckt".

Fourment und Roques[7]) verwenden eine heiß bereitete Lösung von 1 g Benzidin in 10 ccm Eisessig und 30 ccm Wasser, die auf 50 ccm verdünnt wird. Das Reagens färbt außer verholzten Elementen auch Kutikularsubstanzen, Korkelemente, Pektinstoffe und Pflanzenschleime gelb bis orange. Zellulose kann daneben durch Methylenblau (1 : 1000) Benzoazurin (gesättigte Lösung) oder Hämatoxylin gefärbt werden.

Von anderen stickstoffhaltigen Körpern wurden noch verwendet: Pyrrol (Ihl), Chem. Ztg., 1890, XIV, S. 1571), Dimethylparaphenylendiamin (Wurster, Ber. chem. Ges., 1887, XX, S. 808), Indol (Niggl, Flora, 1881, LXIV, 545, wässerige Lösung + Schwefelsäure [1 + 4], kirschrot), Skatol

---

[1]) E. Lortz, Über Drogen, welche Phloroglucotannoide oder ähnliche Gerbstoffe enthalten und Rotfärbung der verholzten Elemente in diesen durch starke Säuren, Apothek.-Ztg., 44, S. 1342 (1929).

[2]) O. Linde, Zur Kenntnis der Verholzung, Arch. d. Pharm., 1906, CCXLIV, S. 57.

[3]) H. Teufer, Mäßig verdünnte Schwefelsäure als Reagens für die Untersuchung von Drogen, Pharm. Zentralhalle, 1927, LXVIII, S. 225.

[4]) E. Senft, l. c. S. 296, 2.

[5]) H. Schneider, Benzidin als Reagens auf Verholzung, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1914, XXXI, S. 68.

[6]) D. Fehér und St. Vági, Über die Verwendung des Benzidins zum Nachweis der Verholzung, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1925, XLII, S. 164.

[7]) P. Fourment und H. Roques, Das Diphenylendiaminazetat (Benzidinazetat) zum mikrochemischen Nachweis und zur Färbung pflanzlicher Gewebe, die Pentosane enthalten, Bull. soc. pharm., Bordeaux 1926, LXIV, S. 22; Jahresb. Pharm., 1926, S. 6.

(Mattirolo, konzentrierte alkoholische Lösung + Salzsäure, violett), Carbazol (Mattirolo, Zeitschr. wiss. Mikr., 1885, II, 354, konzentrierte alkoholische Lösung, Erwärmen + Säure [1 + 1]) u. a.

Mehr Beachtung hat das Dimethylamidoazobenzol gefunden, das als „Gelbglyzerin" verholzte Membranen gelb färbt.

Bereitung des Gelbglyzerins nach Plaut[1])

Dimethylamidoazobenzol wird auf dem Wasserbad in heißem Weingeist gelöst. Der filtrierten konzentrierten Lösung wird ein gleiches Volumen konzentriertes reines Glyzerin zugesetzt, darauf, wenn nötig, nochmals filtriert.

Ebenso werden die Lösungen von Indophenol, Scharlach, Orlean und Fettblau hergestellt.

Der Vollständigkeit halber werden noch folgende Verholzungsreaktionen angeführt:

Methylheptenon (Erdmann, Ber. deutsch. chem. Ges., 1899, XXXII, S. 1213), Amylalkohol (A. Kaiser, Chem. Ztg., 1902, XXVI, 335, gleiche Vol. furfurolfreier Amylalkohol und konzentrierte Schwefelsäure, bis zur Gasentwicklung erwärmt, ein rotgelbes Gemisch, färbt rot bis blau), Isobutyl- und Hexylalkohol (Grafe, Österr. bot. Zeitschr., 1905, LV, 174), 2 Vol. + 1 Vol. Schwefelsäure, 30 Minuten Einwirkung, färbt rotviolett, beim Einlegen in Glyzerin blau.

Von diesen Reaktionen beansprucht die mit Isobutylalkohol Beachtung, bei der sich Ferula- und Kaffesäure nicht färben (bei Sekretbehältern u. a.).

Reaktion von Grüß[3])

Man gibt den Schnitt in einen auf dem Objektträger befindlichen Tropfen Phosphorsäure (1 : 4), streut einige Körnchen Vanadinsäure darauf und beläßt etwa 48 Stunden in der feuchten Kammer. Die verholzten Zellwände werden allmählich gelbbraun mit einem Stich ins Rötliche. Die Reaktion verläuft rascher, wenn man die Schnitte in der Vanadylphosphatlösung aufkocht. Die mit Vanadin gefärbten Schnitte färben sich mit Phloroglucinsalzsäure langsam rötlich, die Vanadinfärbung wird durch Chromsäure verstärkt, durch Ammoniak aufgehoben. Die Phosphorsäure kann durch Schwefelsäure ersetzt werden.

Während die Reaktionen der verholzten Membrane mit Aminen und Phenolen ziemlich sicher auf eine und dieselbe Grundsubstanz

---

[1]) M. Plaut, Mit Fettfarbstoffen gefärbte Terpentinkitte, sowie über die Verwendung des Gelbglyzerins als Holz- und Korkreagens, Ber. deutsch. bot. Ges., 1925, XXXIII, S. 133.

[2]) J. Grüß, Über ein neues Holz- und Vanillinreagens, Ber. deutsch. bot. Ges., 1920, XXXVIII, S. 361.

zurückzuführen sind, ist dies anders für die Verholzungsreaktion von Mäule[1]).

Die Präparate gelangen auf 5 Minuten in eine Schale mit 1 proz. wässeriger Permanganatlösung; sie färben sich braun. Nun werden sie ausgewaschen, indem man die Lösung abgießt und mit Wasser auffüllt. Alsdann werden die Schnitte bis zur Entfärbung mit verdünnter Salzsäure behandelt, abgewaschen und auf dem Objektträger mit Ammoniak versetzt oder Ammoniakdämpfen ausgesetzt (Ammoniakflasche). Die Reaktion ist etwas zeitraubend, kann aber beschleunigt werden, wenn man in den beiden ersten Reagentien kurz aufkocht (Halama). Bei Objekten, die gerbstoffartige Körper enthalten, müssen zur Erzielung klarer Bilder dünne Präparate angewandt werden (Tunmann, Lit. S. 158, 5). — Mäule, v. Faber[2]) u. a. fanden nun, daß verschiedene Membranen sich mit Phloroglucinsalzsäure röten, mit der Mäuleschen Reaktion aber farblos bleiben (Hippuris, Endodermis; Quercus, Kork; Anamirta, Hydathoden; Boehmeria platyphylla, Fasern). Andererseits färben sich die Fasern von Anamirta cocculus, Erythrina lithosperma (Aisslinger) und viele primäre Fasern (Tunmann) mit Phloroglucin schwach, mit Kaliumpermanganat stark.

Sharma[3]) stellte fest, daß die Mäulesche Reaktion bei einer großen Anzahl von Gymnospermen ausbleibt. Dies gilt nach A. Fietz[4]) auch für fossile Nadelhölzer, während sie mit fossilen Laubhölzern gelingt. Siersch[5]) stellte folgendes fest: „Wenn man im Pflanzenreiche von der untersten Stufe aufwärts steigt, so setzt die Rotfärbung mit dem Mäulereagens erst bei manchen Selaginella-Arten ein — bei einigen konnte nur Braunfärbung beobachtet werden —, während die Phloroglucinreaktion schon von den Farnen angefangen positiv verläuft. Die Gymnospermen weisen ganz vereinzelt positiven Ausfall der Manganatreaktion auf. Erst bei den Dikotyledonen herrscht positiver Verlauf der Mäuleprobe vor; eine Ausnahme ergab hier nur Nuphar luteum. Bei den Monokotyledonen konnte wieder öfters nur Braunfärbung mit $KMnO_4$ festgestellt werden."

Nach Géneau de Lamarlière[6]) tritt aber die Reaktion bei

---

[1]) C. Mäule, Verhalten verholzter Membranen gegen Kaliumpermanganat, Fünfstücks Jahrb., 1902.

[2]) v. Faber, Zur Verholzungsfrage, Ber. d. bot. Ges., 1904, XXII, S. 167.

[3]) G. D. Sharma, Botanical Abstracts, 1925, XIV, Journ. Forest., 1922, XX.

[4]) A. Fietz, Fossile Hölzer aus Schlesien, Jahrb. d. geol. Bundesanstalt, 1926, LXXVI.

[5]) E. Siersch, Vergleichende Versuche über die Mäule- und Phloroglucinreaktion beim Nachweis der Verholzung, Mikrochemie, 1926, IV, S. 188.

[6]) L. Géneau de Lamarlière, Recherches sur quelques réactions des membranes lignifiées, Rev. gen. de Bot., 1903, XV, S. 149.

Gymnospermen und Gefäßkryptogamen ein, wenn man das Permanganat durch Kaliumchlorat und verdünnte Salzsäure ersetzt. Sonst läßt sich auch nach demselben Autor das Kaliumpermanganat als Oxydationsmittel ersetzen durch rauchende Salpetersäure (Gelbfärbung, je länger die Säure einwirkt, um so schwächer ist die Färbung), durch Kaliumhypochlorit, mit etwas Kalilauge versetzt (Gelbfärbung) und durch 1—5proz. wässerige Chromsäure (Rotfärbung).

v. Wisselingh fand, daß Permanganat und Salzsäure in manchen Fällen durch Natriumhypochlorit und Essigsäure ersetzt werden können; doch geht die Reaktion dann nicht streng mit der ursprünglichen Mäuleschen parallel.

Daß das Ammoniak auch durch Ätzalkalien ersetzt werden kann, hatte bereits Mäule festgestellt.

Über die Bedeutung der Mäuleschen Reaktionen gehen die Ansichten noch auseinander. Während Casparis die Ansicht vertritt, daß die Reaktion charakteristisch für ein Lignin ist und in nahem Zusammenhang mit der Chlorsulfitreaktion von Cross und Bevan steht, vertritt Siersch auf Grund ihrer Untersuchungen die Meinung, daß die Mäulesche Reaktion überhaupt nicht als Reaktion auf verholzte Membranen angesehen werden könne, da die Mäule-Reaktion noch eintreten kann, wenn die Phloroglucinreaktion negativ verläuft. Dies ist z. B. der Fall, wenn man Schnitte von Robinia-Holz 20 Stunden mit Javellescher Lauge behandelt oder 30 Minuten mit 30proz. Wasserstoffperoxyd erwärmt. Die Meinungsunterschiede erklären sich dadurch, daß die Mäulesche Reaktion in Wirklichkeit eine Reaktion des reinen Lignins ist, die Phloroglucin-Salzsäurereaktion nicht (vgl. S. 971).

Durchaus eigenartig ist die von Casparis[1]) aufgefundene Verholzungsreaktion, die Kobaltrhodanid als Reagens verwendet.

Man stellt sich das Reagens am einfachsten so her, daß man eine konzentrierte wässerige Lösung eines Kobaltsalzes mit einer konzentrierten wässerigen Lösung von Rhodankalium oder Rhodanammonium versetzt. Die Konzentration an Kobaltsalz soll zwischen 15 und 40 % liegen, die Farbe violettrot bis violett sein.

Die verholzten Zellwände färben sich damit blau. Stärke wird am besten vor Anstellung der Reaktion durch kurzes Behandeln mit Chloral entfernt. Die Reaktion geht mit der Chlorzinkjod-, aber nicht durchweg mit der Phloroglucinsalzsäure- und Mäulereaktion parallel, sie tritt beispielsweise schon in frühen Stadien der Verholzung ein, in denen die andern Verholzungsreaktionen noch negativ sind. Die Ursache der Reaktion liegt in dem starken Adsorptionsvermögen verholzter Membranen; sie ist eine Kolloidreaktion.

---

[1]) P. Casparis, Beiträge zur Kenntnis verholzter Zellmembranen, Pharm. Monatsh., 1920, I, S. 121.

Casparis Reagens färbt auch Stärke und Eiweißkristalle (Molisch); in 50 proz. Lösung geht der wasserlösliche Anteil der Stärke sofort in Lösung.

Andererseits läßt sich mit Casparis Reagens die Verholzung der Mittellamelle des Korkes von Quercus suber nicht nachweisen[1]).

Eine Ligninreaktion ist die bereits S. 970 erwähnte rote bis braune Färbung, die eintritt, wenn man Holz erst mit feuchtem Chlor (Gelbfärbung) und dann mit Alkalisulfit behandelt (Cross und Bevan).

Die Reaktion von Ungar ist von ihrem Entdecker nur makrochemisch ausgeführt worden: Fichtenholzmehl wird in verdünnter Sodalösung suspendiert. Nach Zusatz von ein wenig Diazoniumchloridlösung[2]) filtriert man ab und wäscht aus. Das Holz ist dann ziegelrot gefärbt. Ähnliche Färbungen treten auch mit diazotiertem β-Naphthylamin, o-Nitranilin, p-Phenylendiamin und dgl. ein. Durch verdünnte Salzsäure geht die ziegelrote Farbe in Hellbraun über.

Schnitte legt man besser in eine soda-alkalische Lösung von Diazobenzolsulfosäure und beläßt einige Minuten. Nach Abgießen der Lösung betrachtet man in Wasser und kann dann noch mit Salzsäure ansäuern (Rosenthaler).

Ebenfalls von Ungar rührt die Angabe her, daß Fichtenholzmehl mit konzentierter Salzsäure erst gelb, dann grün wird, bis schließlich die Farbe nach längerem Stehen schmutzig wird.

Ohne praktische Bedeutung ist die Reaktion von Combes (Bull. sciences pharmacol., 1906, XIII, S. 293); sie wird erwähnt, weil sie vielleicht theoretisch nicht ohne Interesse ist. Nach Combes erhält man durch Reduktion der Blei- oder Zinkverbindungen der Lignine mit Schwefelwasserstoff oder Schwefelammonium einen Stoff, der sich durch konzentrierte Schwefelsäure rot färbt. Die Nachprüfung ergab, daß die Reaktion auch ohne Vorbehandlung des Lignins mit Zink- oder Bleisalzen eintritt.

In vielen Fällen lassen sich Farbstoffe zur Kennzeichnung verholzter Membranen heranziehen, wenn sie auch wohl in keinem Fall als typische Verholzungsreagentien gelten dürfen.

Methylgrün färbt nach Vorbehandlung mit Javellescher Lauge verholzte Membranen in wenigen Minuten leuchtend grün (Kisser)[3]). Man erzielt Rotfärbung verholzter Zellwände, wenn man die Schnitte 2—3 Minuten in eine 20 bis 30proz. Lösung von Spirsil bringt und nach 2—3 Minuten in destilliertem Wasser auswäscht (Fehér und Szilvási)[4]).

---

[1]) Greger, Bemerkungen über das Rhodankobalt als mikrochemisches Reagens, Biochem. Zeitschr., 1927, CLXXXV, S. 438.

[2]) Eine Mischung von 10 ccm Lösung I und 0,2 ccm Lösung II: I 0,5 g feingepulverte Sulfanilsäure werden kalt in 90 ccm Wasser gelöst, die Lösung wird nach Zusatz von 5 ccm Salzsäure auf 100 ccm aufgefüllt; II 0,5 proz. Lösung von Natriumnitrit.

[3]) J. Kisser, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1924, XLI, S. 84.

[4]) D. Fehér und S. Szilvási, Über einen neuen Farbstoff in der Bakteriologie und Histologie, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1925, XLII, S. 166.

Stecowna[1]) verwendet für die Färbung verholzter Zellwände eine 0,001proz. mit Alkali eben gelbgefärbte Lösung von Methylrot. Die verholzten Membranen färben sich rot.

Scala[2]) bringt Schnitte zunächst in die 0,2proz. Lösung eines Anilinfarbstoffs, dann kurz in Javellesche Lauge, wäscht dann reichlich mit Wasser, bringt auf drei Minuten in eine verdünnte Lösung (2 Tropfen der ursprünglichen Lösung, 15 Tropfen Wasser) und wäscht nochmals aus. Malachitgrün färbt so verholzte Membranen blaugrün, Zellulosewände schwach hellblau oder gar nicht, Kutikula und Fasern des Perikambiums in verschiedenem Tone grünlichblau.

Buxbaum[3]) bringt die Schnitte für einige Minuten in verdünnte, etwa weinrote Lösung von Delafieldhämatoxylin; Überfärbung ist zu vermeiden; Auswaschen in destilliertem Wasser, hiernach mehrere Stunden in goldgelbe wässerige oder weingeistige Chrysoidinlösung, dann 30-, 50-, 70- und 90proz. Weingeist, in dem die Differenzierung erfolgt, bis nur noch die verholzten Elemente goldgelb sind, dann absoluter Alkohol oder Karbolxylol (10% Xylol + 6 Teile kristallisiertes Phenol), Xylol, Kanada oder Dammar.

Verholzte Zellwände lassen sich, wie Gertz[4]) fand, allgemein mit Anthocyanen der Vitisgruppe (Darstellung s. S. 384) färben. Man legt die Schnitte je nach der Frische der Lösung kürzere oder längere Zeit (bis zu 12 Stunden) in die mit Schwefelsäure angesäuerte Lösung, wäscht mit destilliertem Wasser und beobachtet entweder sofort oder nach Behandlung mit Bleiessig (vgl. S. 757).

Die vergleichende Untersuchung mit anderen Verholzungsreagentien zeigte, daß die Anthocyanfärbung nicht in allen Fällen mit der Phloroglucin-Salzsäurereaktion übereinstimmte. So verlief die Phloroglucin-Salzsäurereaktion bei manchen Bastfasern negativ, die durch Anthocyan gefärbt wurden. Umgekehrt bleibt die Anthocyanreaktion bei primären Gefäßen in der Regel aus, obgleich sie sich mit Phloroglucinsalzsäure rot färbten. Im allgemeinen geht die Anthocyanreaktion der Mäuleschen Permanganatreaktion parallel.

Die Färbung mit Anthocyan trat — ebenso wie die mit Fuchsin — in den meisten Fällen auch noch ein, wenn die Holzelemente zuvor mit Schultzes Mazerationsflüssigkeit behandelt waren, ist aber nicht ganz eindeutig, da auch Kollenchym, wenn auch schwächer und mit anderer Nuance, gefärbt wird. Da

---

[1]) W. Stecowna, La rouge de méthyle comme le réactif pour les membranes lignifiées Acta soc. Bot. Polon., 1926, III, S. 138, Bot. Zentralbl. 1926, VIII, S.158.

[2]) A. C. Scala, Segunda contribucion al estudio de las dobles coloraciones diferenciales obtenidas con un solo colorante, Rev. Chil. Hist. Nat., 1925, XXIX, S. 161, nach Bot. Zentralbl., 1926, N. F. IX, S. 6.

[3]) F. Buxbaum, Eine ideale Holz-Zellulose-Doppelfärbung, Mikrokosmos, 1926/27, XX, S. 192; Ref. in Zeitschr. wiss. Mikr., 1927, XLIV, S. 393.

[4]) O. Gertz, Über die Verwendung von Anthocyanfarbstoffen für mikrochemische Zwecke, Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1916, XXXIII, S. 7.

die Färbung nicht durch das Lignin bedingt sein kann — Nichtparallelität mit der Phloroglucin-Salzsäurereaktion und Eintreten nach Behandlung mit Permanganat — auch Pektin dafür nicht in Frage kommt, da die Mittellamelle junger Zellen nicht gefärbt wird, so ist Gertz der Ansicht, daß es bestimmte Hemizellulosen sind, die den Farbstoff adsorbieren.

Schließlich sei noch die Angabe von Scarth, Gibbs und Spier[1]) erwähnt, daß für ein einzelnes Holz die Ergebnisse der Phloroglucin-Reaktion und basophilen Färbung mit denen der Lösungsmittel übereinstimmen, aber nicht bei Vergleich verschiedener Holzarten.

Kork und Kutikula

Das Suberin ist wie das Kutin ein aus spezifischen hochmolekularen gesättigten und ungesättigten Oxyfettsäuren bestehendes hochpolymeres Produkt. Glyzerin ist an seinem Aufbau nicht beteiligt (Zetzsche und Mitarbeiter)[2]).

Der Hauptunterschied zwischen Kutin und Suberin besteht darin, daß das Suberin viel gesättigte Oxyfettsäuren aufweist, während im Kutin die Phellonsäure nicht und die Phloionsäure nur in geringer Menge gefunden wurde (Sonderegger).

Ein von begleitenden Gerüstsubstanzen völlig freies Suberin konnte bisher noch nicht dargestellt werden.

Die im folgenden angegebenen Eigenschaften beziehen sich auf das Suberin des technischen Eichenkorkes.

Durch halbstündiges Kochen in Glyzerin wird Suberin so weit abgebaut, daß es nach Auswaschen mit Wasser in Weingeist löslich ist. Nach mehrstündiger Einwirkung wird es von siedendem Anilin oder Tetralin gelöst. Am schnellsten wird es zersetzt, wenn man es in Paraffin auf 350—400° erhitzt.

Erhitzen mit Wasser auf 120° zerlegt es in die Korkfettsäuren, ebenso heiße Mineralsäuren.

Durch Karbonate, Ätzalkalien und Kupferamminlösung wird das Suberin verseift.

Das Auftreten einer rotvioletten bis kupferroten Farbe nach mehrstündigem Liegen in Kalilauge, Auswaschen mit Wasser und Zusatz von Chlorzinkjod ist nicht auf Suberin zurückzuführen.

Die aus dem Suberin entstehenden Säuren sind: Phellonsäure, Phloionsäure, Phloionolsäure, Suberolsäure und Suberinsäure. Das Verhalten gegen Oxydationsmittel ist dem des Kutins analog, nur wird es noch rascher angegriffen.

---

[1]) G. W. Scarth, R. D. Gibbs u. J. D. Spier, Untersuchungen über die Zellwände des Holzes. 1. Der Bau der Zellwand und die örtliche Verteilung der chemischen Bausteine, Transact. Roy. Soc. Canada (3), XXIII, Sekt. 5, S. 269.

[2]) F. Zetzsche und G. Rosenthal, Untersuchungen über den Kork, Helv. chim. acta, 1927, X, S. 346. — G. Sonderegger, Das Suberin und seine Säuren, Inaug.-Diss., (Phil. Fak. II) Bern 1929. Letzterer fand im Eichenkork 1½—2 % Zellulose.

Kork und Kutikula besitzen sehr geringe Durchlässigkeit für Wasser und Gase, schützen die Pflanzen vor zu starker Verdunstung, verhindern aber auch, daß Wasser an den mit ihnen versehenen Stellen eintritt. Im Innern der Gewebe regeln sie die Bahnen des Stofftransportes (Endodermis, Casparysche Streifen, A. Meyer, Kroemer) und ermöglichen einen relativen Abschluß der Sekrete (Öldrüsen und Sekretbehälter). Die Permeabilität hängt offenbar von verschiedenen Faktoren ab. Kork von Beta und die Kutikula von Allium sind für Salze impermeabel (W. Wächter, Lit. S. 727), die Kutikula von Cynara ist für Salzlösungen permeabel (J. K. Goebel, Diss. Leipzig 1903, S. 20).

Nach Lee und Priestley[1]) ist die Kutikula eine auf der Pflanze befindliche Fettlage, ein an der Luft oxydiertes und kondensiertes Gemisch von Fettsäuren mit anderen Stoffen. Das Material für die Kutikula ist Protoplasmafett, das den Zellwänden entlang an der Oberfläche wandert. Die unter der Kutikula liegenden kutinisierten Schichten bestehen nach denselben Autoren aus Zellulose, die mit Fettlagen imprägniert ist. Licht und Feuchtigkeit sind auf Dicke und Konsistenz der Kutikula von Einfluß, weil sie die zu gleicher Bildung erforderliche Oxydation und Kondensation der Fettsäuren beeinflussen.

Fig. 187. Drüse von Viola, nach mehreren Schleimergüssen; nur eine Kutikula (*cut*), die bei *x* gesprengt ist, *gh 1, 2, 3* sind Grenzhäutchen (Tunmann)

Die Kutikula bedeckt bereits die jugendlichen Organe als ein kontinuierliches Häutchen. Meist bleibt sie dauernd erhalten. Eine Auflösung (Enzyme) erfolgt zuweilen bei nachträglicher Verbindung von ursprünglich freiangelegten Organen (Bild. d. Scheidewände d. Cruciferen, E. Hannig, Bot. Ztg., 1901, LIX, 207). Eine Regeneration nach künstlicher Abtragung hat Tittmann (Jahrb. f. wiss. Bot., 1897, XXX, 116) bei Agaven und bei Aloe festgestellt. Die von Hanstein (1868) angegebene Regeneration bei den Epidermaldrüsen findet jedoch nicht statt (Tunmann, Lit. S. 354, 4). Es kommt nur (bei Schleimdrüsen, Fig. 187) zur Bildung sehr widerstandsfähiger, sog. Grenzhäutchen (auch bei H. Kraemer, Diss. Marburg 1897). Hingegen findet sich Neubildung der Kutikula bei den sog. Doppelhaaren (Lit. S. 889, 2).

Bei der Aufarbeitung der Kutikula von Agave rigida fanden sie Legg und Wheeler zusammengesetzt aus: 10% wasserlöslichen Stoffen, 20% Wachs, 15% Zellulose und 55% Kutin (Journ. chem. soc., London 1929, S. 2444).

Reines Kutin ist aus den Blättern von Agave americana dargestellt worden[2]). Es ist gegen Hitze sehr widerstandsfähig. 75proz. Schwefel-

[1]) B. Lee and I. H. Priestley, The Plant cuticle. Its structure, distribution and function. Annals of Botany 1924, XXXVIII, S. 525.

[2]) V. H. Legg u. R. V. Wheeler, Journ. of chem. soc. 1925, CXXVII, S. 1412.

säure, 85proz. Phosphorsäure und 38proz. Salzsäure hydrolysieren es bei Zimmertemperatur auch bei mehrtägiger Einwirkung nur in Spuren, in der Hitze unter Zersetzung.

Sodalösung, Ammoniak und Kupferamminlösung greifen es nicht an. Durch 15—20proz. wässerige und durch weingeistige Lauge wird es unter Entstehung von Alkalisalzen der Kutinfettsäuren verseift. Als solche Säuren geben Legg und Wheeler u. a. an: Kutinsäure und Kutininsäure. Wahrscheinlich kommen auch Phellonsäure und Phloionolsäure vor.

Konzentrierte Schwefelsäure färbt Kutin nach längerer Einwirkung braun, Jodschwefelsäure färbt es gelbbraun. Die durch Alkalien eintretende gelb-hellorange Färbung wird durch einen Gehalt an Chromolipoiden hervorgerufen.

Angefärbt wird Kutin u. a. durch Sudan III, Erythrosin, Gentianaviolett und Safranin.

Die Frage, ob die Kutine aller Pflanzen identisch sind, ist noch nicht entschieden.

Die bei der Cerinsäurereaktion auftretenden Tröpfchen bestehen aus chlorierten und nitrosierten Spaltungsprodukten der spezifischen Fettsäuren.

Durch Salpetersäure und alkalisches Hypobromit wird Kutin rasch abgebaut.

Die schwere Angreifbarkeit des Kutins durch 50—60proz. Kalilauge hängt nach Zetzsche damit zusammen, daß die entstehenden Kalisalze in diesen Laugen nahezu unlöslich sind und auf der Membran niedergeschlagen den weiteren Angriff verzögern.

Kutin wird durch ammoniakalisches Wasserstoffperoxyd nicht angegriffen (König) noch durch 75proz. Schwefelsäure (Lüdtke).

Der Belag der Vittae der Umbelliferenfrüchte besteht nach van Wisselingh aus einem kutinähnlichen Stoff; auch in den Epithelwänden kommen Stoffe vor, welche dem Kutin oder Suberin ähnlich sind.

Mit der Hüllmembran der Sekretzellen des Rhizoms von Asarum europaeum erhielt Kiehn folgende Reaktionen: Nach Behandlung mit Jodjodkalium bleibt nach Auswaschen mit Wasser die Hüllmembran länger gelb gefärbt als die Kohlenhydratlamellen der Parenchymzellen. Bei Behandlung mit Kongorot tritt nach dem Auswaschen mit Wasser das Häutchen sehr deutlich gefärbt hervor. Safranin und Methylviolett färben, Rutheniumrot kaum, Chlorzinkjod gelbbraun. Die Membran quillt in 10proz. Ammoniak und löst sich innerhalb 1—2 Minuten in 2proz. Kalilauge; wird durch Trypsin nicht angegriffen.

„Durch Einlagerung von Kutin in die Membranen kehrt sich ihr optischer Charakter um, so daß nun der kleinere Brechungsindex $n\,\alpha$ tangential und der größere $n\,\gamma$ radial verläuft“ (Frey-Wissling).

Bei ultramikroskopischer Betrachtung zeigen Korkmembranen das gleiche Bild wie verholzte Wände: annähernd parallele Reihen stark leuchtender und großer Micellen wechseln mit optisch leeren Reihen ab (Gaidukov, S. 711). Im polarisierten Lichte zeigen Kutikula und Kork ebenso wie reine Zellulosemembranen starke Doppelbrechung[1]), die, und dies ist das Charakteristische, beim Erhitzen der Membranen auf 100° verschwindet, um beim Erkalten wieder aufzutreten[2]). Suberin und Kutin bewirken eine, wenn auch geringe Erniedrigung der von der Zellulosemembran gegebenen Polarisationsfarben. Die eigentlichen Suberinlamellen sind meist zart. Bei den Korkzellen ist die Mittellamelle meist verholzt, der beiderseits Suberinlamellen anliegen, die wiederum von Zelluloseschichten eingefaßt werden; die letzteren können zuweilen ebenfalls mehr oder weniger verholzen (Cytisus).

Die Mikrochemie von Kork und Kutikula beruht auf Lösungsreaktionen, der Cerinreaktion und auf Färbungen. — Chromsäure, in größerem Maßstabe zuerst von v. Höhnel (Lit. S. 975, 3) benutzt, liefert in bequemer Weise sichere und für die Praxis oft genügende Ergebnisse. Man benutzt eine konzentrierte Chromsäurelösung (50 proz.). In dieser löst sich das gesamte Gewebe bis auf Kork- und Kutinmembranen (und verkieselte Membranen, S. 165). Bei größeren Präparaten erschwert die bei der Lösung eintretende Gasentwicklung eine Beobachtung während der Einwirkung und macht sie zuweilen unmöglich. Man unterbricht daher die Reaktion, indem man nach einigen Minuten Wasser durchsaugt und die Wirkung der Säure mikroskopisch feststellt. Das Verfahren (abwechselnder Zusatz von Säure und Wasser) wird bis zum gewünschten Erfolge fortgesetzt[3]). Bei einiger Übung wird man bereits bei Beginn der Reagenseinwirkung zu einem Ergebnis gelangen, da die Suberinlamelle sich sowohl von der verholzten Mittellamelle als auch von der aufquellenden und schnell in Lösung gehenden Zellulose scharf abhebt. Von der Anwendung einer schwächeren Lösung (als 50 proz.) ist abzuraten[4]), ebenso darf nicht erwärmt werden, da kochende

---

[1]) Im allgemeinen sind die optischen Achsen in den kutinisierten und verkorkten Membranen umgekehrt orientiert wie in den Zelluloselamellen; erstere zeigen Subtraktionsfarben, letztere Additionsfarben, wenn bei gekreuzten Nicols die Kutikula parallel zu der längeren Achse des Gipsplättchens verläuft (A. Zimmermann, Molekularphys. Unters., Ber. d. bot. Ges., 1884, II, 124).

[2]) H. Ambronn, Optisch. Verhalt. d. Kutikula u. d. verkorkt. Membranen, Ber. d. bot. Ges., 1888, VI, S 226

[3]) C. Hartwich, Sarsaparill., Ber. pharm. Ges., 1907, XVII, S. 262.

[4]) Im Gegensatz zu dem Rate Tunmanns wird vielfach nur 25 proz. Chromsäure verwendet, so von van Wisselingh und seinen Schülern und Netolitzky.

Chromsäure Kork- und Kutinlamellen löst[1]). Übrigens ist die Unlöslichkeit in kalter Chromsäure nur eine relative, denn nach längerer Zeit (einige Tage) gehen Kork und Kutikula je nach dem Grad der Verkorkung und Kutinisierung in Lösung; die nur schwach kutinisierten Lamellen lösen sich weit leichter[2]). Weniger scharf treten Differenzen in der Löslichkeit zwischen der Kutikula und der Suberinlamelle hervor; Suberin scheint weniger widerstandsfähig zu sein. Erhitzt man die Präparate im zugeschmolzenen Röhrchen in Glyzerin auf 300°, dann gibt nachher Chromsäure mit der Suberinlamelle (im Gegensatz zur Kutikula) ein sehr leicht lösliches Zersetzungsprodukt[3]).

Durch mehrstündiges Erhitzen von Schnitten in destilliertem Wasser bei ungefähr 200° wird die Korksubstanz zersetzt. Sie verschwindet fast ganz aus den Schnitten oder läßt blasige Zersetzungsprodukte zurück, die in Weingeist löslich sind (van Wisselingh).

Kork- und Kutinlamellen sind unlöslich in konzentrierter Schwefelsäure und in Kupferoxydammoniak. Diese beiden Reagentien (völlig konzentrierte Säure, frisch bereitetes Cuoxam) können zur Orientierung dienen. Sie liefern keine guten Bilder, Holz erscheint durch Kupferoxydammoniak bei mikroskopischer Betrachtung kaum verändert und wird durch Schwefelsäure nur sehr langsam gelöst.

Die v. Höhnelsche Cerinsäurereaktion ist recht charakteristisch, für praktische Zwecke aber etwas umständlich. Verkorkte Lamellen widerstehen Kaliumchlorat-Salpetersäure in der Kälte länger als andere Membranen, kocht man jedoch einige Zeit, dann bilden sich kleine ölartige Tröpfchen, die, ähnlich wie die fetten Öle, ineinanderfließen und die sich in Äther, heißem Weingeist, Benzol, Chloroform und in verdünnter Kalilauge lösen, in Schwefelkohlenstoff unlöslich sind und bei 30—40° schmelzen. Diese Substanz wird Cerinsäure genannt.

Die mit Chromsäure oder Kaliumchlorat-Salpetersäure behandelten Präparate werden in der gleichen Weise weiter behandelt. Man wäscht mit Wasser aus, wenn nötig auch mit sehr verdünnter Natronlauge, die dann auch wieder sehr sorgfältig ausgewaschen werden muß. Auf Zusatz von sehr verdünnter (etwa 1 proz.) Jodjodkaliumlösung färben sich Kutikula und Korklamellen gelb oder hellbraun. Zusatz von $66^1/_2$ proz. Schwefelsäure färbt dann die Zellulosewände schön blau. Setzt man

---

[1]) F. v. Höhnel, Bemerk. üb. d. Kutikula, Österr. bot. Ztschr., 1878, XXVIII, S. 84.

[2]) Den Algen fehlt meist eine Kutikula; die Schleimoberhaut (Laminaria) ist in Chromsäure löslich.

[3]) C. v. Wisselingh, Cuticul. et cutine, Arch. Néerl., 1894, XXVIII, 373.

dann konzentriertere (76-, $85^1/_2$- und 96proz.) Schwefelsäure hinzu, so wird die Zellulose aufgelöst (van Wisselingh, van der Wal)[1].

3proz. weingeistige Kalilauge löst bei andauerndem Kochen die Suberinlamelle ohne Rückstand auf, während Zellulose bei dieser Behandlung nicht angegriffen wird. Hiermit ist erwiesen, daß in der Suberinlamelle Zellulose fehlt (Gilson). — Konzentrierte Kalilauge bewirkt nach einiger Zeit deutliche Gelbfärbung. Beim Erwärmen tritt die Färbung schärfer hervor. Ähnlich verhalten sich verholzte Wände. Beim Aufkochen werden die verkorkten Membranen aber körnig und erscheinen mit feinen Tröpfchen bedeckt, die bei längerem Kochen in Gestalt größerer Tröpfchen hervortreten und hier und da ganz aus der Membran austreten. Es ist ratsam, die Reaktion nach dem Vorschlage Kroemers[2]) *erst nach Mazeration der Präparate mit Eau de Javelle* (s. unten) und Auswaschen derselben mit 1proz. Salzsäure vorzunehmen. Im allgemeinen soll nach van Wisselingh die Kutikula länger der Lauge widerstehen als Suberinlamellen. Die Kutikularschichten erweisen sich gegen Kalilauge sehr wenig widerstandsfähig.

Jodschwefelsäure und Chlorzinkjod färben Kork und Kutikula gelb, auch braun. Chlorzinkjod wurde früher vielfach benutzt. Die Reaktionen sind aber nicht eindeutig, da Holz, Hemizellulosen und verschleimte Membranen sich ebenso verhalten. Werden die Schnitte aber zuvor 1—2 Stunden mit Eau de Javelle behandelt, dann färbt Chlorzinkjod Holz schmutzig violett, Kork und Kutikula gelb.

Werden die Präparate mehrere Stunden mit 40proz. Natronlauge (Gilson)[3]) mazeriert oder mit der Lauge kurz aufgekocht, dann gibt nach gutem Auswaschen Chlorzinkjod (auch Jodjodkalium) mit Suberinlamellen eine rotviolette Färbung. Diese Färbung bleibt aus, wenn der Behandlung mit Chlorzinkjod eine Extraktion der Schnitte mit siedendem Weingeist vorangeht. Auch wird das Suberin zerstört, wenn man die Präparate in Glyzerin auf 250—290° erhitzt; ein Zelluloserückstand ist dann nicht nachweisbar. In den kutinisierten Schichten läßt sich aber nach Mazeration mit verdünnten Alkalien durch Jodreagentien eine zellulosehaltige Grundlage nachweisen (van Wisselingh)[4]).

---

[1]) J. van der Wal, Bijdrage tot de kennis van de zaadhuid usw., Diss. Groningen 1921.

[2]) K. Kroemer, Wurzelh., Hypodermis u. Endodermis, Diss. Marburg 1903, S. 9 u. Bibl. bot. Heft 59.

[3]) E. Gilson, La subérine et les cellules du liège, La Cellule, 1890, VI, S. 63—114.

[4]) C van Wisselingh, S. la paroi de cellules subéreuses, Arch. Néerl., 1888, XII u.: S. la lamelle subéreuse et la subérine, Arch. Néerl., 1892, XXVI, S. 305.

Kutikula und Korkmembranen einiger Pflanzen (Nymphaea, Ranunculus, Helleborus, Convallaria, Ilex, Rosmarinus u. a.) geben mit Fuchsinschwefliger Säure (S. 346) eine violette Färbung (Aldehyd, Géneau de Lamarlière, Bull. Soc. bot. France, 1903, S. 268).

Kork und Kutikula werden durch viele Farbstoffe gefärbt; als scharfer Beweis für ihr Vorhandensein darf eine Färbung nicht betrachtet werden. Seit Correns[1]) benützt man die sog. Fettfarbstoffe (S. 247). Da aber auch Holz die Farbstoffe annimmt, so wird das Färbungsvermögen des Holzes durch Eau de Javelle zerstört (Mangin, Lit. S. 969, 1, Zimmermann, Lit. S. 969, 1), während die Färbkraft von Kork und Kutikula selbst nach 60stündiger Einwirkung der Lauge, zuweilen nach wochenlanger Wirkung (Kroemer) nicht abnimmt. Die Präparate werden mit Eau de Javelle eine Stunde oder länger mazeriert (die Suberinlamellen treten dann scharf hervor, legen sich öfters in kleine Falten, Kroemer), gut mit 1 proz. Salzsäure ausgewaschen und schließlich gefärbt. Die Färbung läßt sich auf dem Deckglase ausführen (bei zarten Objekten vorteilhaft). Die Farbstoffe, meist in 0,1—0,2 proz. Lösungen benutzt, werden teils in Weingeistglyzerin (zu gleichen Teilen, Sudan III, Alkannin, Cyanin), teils in Weingeist gelöst (Chlorophyllgrün, Scharlach R, Sudan III). In der Kälte vollzieht sich die volle Färbung in einigen Stunden, durch Erwärmen wird sie sehr beschleunigt. Ausgewaschen wird mit Glyzerinwasser (oder Wasser), untersucht in Glyzerin. Nur die mit Eau de Javelle behandelten Präparate liefern diagnostisch einwandfreie Färbungen[2]). Daher ist auf genügend lange Einwirkung der Lauge zu achten, die auch störende Gerb- und Farbstoffe (Phenole u. a.) entfernt.

Auch Anilinfarben können zur Färbung dienen. Tison[3]) benutzt konzentrierte weingeistige Lösungen von Gentianaviolett, Dahlia, Methylgrün, die durch Ammoniakzusatz entfärbt sind, auch Mangins Pektinfarbstoffe, Säuregrün und Pariser Violett, Bäsecke[4]) Anilinrot, Fuchsin, Malachitgrün, Pyoktanin, Naphthylenblau u. a. Auch hier erfolgt Vorbehandlung mit Eau de Javelle, dann Färbung (einige Mi-

---

[1]) C. E. Correns, Anat. u. Entw. extranuptialer Nektarien v. Dioscorea, Sitzgsb. Wien. Ak., 1888, XCVII, $_1$, 658.

[2]) Auch bei Doppelfärbungen (S. 911) werden Suberin- und Kutinmembranen gefärbt, gewöhnlich in nur wenig abweichender Farbe wie Holz, da ja bei Doppelfärbungen eine Vorbehandlung mit Eau de Javelle nicht stattfinden darf (um das Farbvermögen des Holzes nicht zu zerstören).

[3]) A. Tison, Méthode nouvelle de coloration des tissus subéreux, Compt. rend., 1899, S. 454.

[4]) P. Baesecke, Physiolog. Scheiden d. Achsen u. Wedel d. Filicinen, Ersatz des Korkes b. d. Pflanzengruppe, Bot. Ztg. 1908, LXVI, S. 26.

nuten), Auswaschen mit 5—10proz. Salz-, Salpeter- oder Schwefelsäure und Einlegen in Glyzerin.

Dimethylamidoazobenzol (s. a. S. 979) färbt in nicht mit Eau de Javelle behandelten Schnitten zunächst nur die Suberinlamellen gelb, nach einiger Zeit aber auch verholzte Membranen. Zusatz eines Tropfens verdünnter Salzsäure gestattet beide Lamellen sofort zu unterscheiden, da nur die verholzten Lamellen rot werden (M. Plaut, Veränd. im Bau d. Wurzel während des Winters, Jahrb. wiss. Bot., 1910, XLVIII, S. 151).

Man kann auch die Schnitte nach Behandlung mit Eau de Javelle in ein Uhrschälchen mit ganz schwach mit Salzsäure angesäuertem Wasser bringen und von da in das Gelbglyzerin übertragen. Man sieht dann die verkorkten Zellen gelb, die Gefäße fuchsinrot (Plaut 1915). Man kann auch mit Plaut die verholzten Elemente zunächst mit Anilinsulfat färben und dann die Schnitte mit Indophenol (weingeistige mit gleichviel Glyzerin versetzte Lösung) behandeln. Verkorkte Zellmembranen und Kutikula färben sich damit blau.

Prodigiosin färbt Kork, Kutikula und Fette stark rot; die schwache Färbung, die andere Zellinhalte und verholzte Membranen annehmen, schwindet sofort beim Auswaschen mit Alkohol. Zu Doppelfärbungen dient weingeistiges Malachitgrün. Prodigiosin, ein Bakterienstoff, wird von Bact. prodigiosum (Bezugsquelle: Králs Labor., Prag) gewonnen, das sich auf Kartoffelscheiben in feuchter Kammer bei 25° in 3—4 Tagen in genügender Menge ziehen läßt. 5 g Bakterienmasse mit 30 ccm 95proz. Weingeist verrieben gibt filtriert das Reagens (ziegelrote Flüssigkeit, das sich vor Licht geschützt, einige Monate hält (O. Rosenberg, Verwend. v. Prodigiosin in d. bot. Mikrotechnik, Ztschr. f. wiss. Mikr., 1898, XV, 56).

Zur Untersuchung kutinisierter und verkorkter Wände (aber auch zur Unterscheidung verholzter und nichtverholzter) ist Cerasinblau I in 0,6proz. weingeistiger Lösung geeignet (Schwarz)[1]. Die Schnitte bleiben 1—2 Tage in der Lösung, kommen 1—2 Minuten in etwa 50proz. Weingeist und kommen dann in Wasser oder in die Lösung von Rosazurin B.

Unverholzte Wände bleiben in Cerasinblau farblos, verholzte Wände nehmen den Farbstoff um so weniger auf, je dichter sie sind, sehr dichte und ältere kutinisierte Membranen werden von Cerasinblau am stärksten gefärbt. Man erreicht so mit Cerasinblau eine Färbung, welche der durch die meisten substantiven Farbstoffe entgegengesetzt ist.

Nach Lee und Priestley[2]) sind die besten Färbungsmittel für

---

[1]) F. Schwarz, Metachromatische Färbungen pflanzlicher Zellwände durch substantive Farbstoffe, Ber. deutsch. bot. Ges. 1923, XLI, S. (21), (28).

[2]) B. Lee und I. H. Priestley, The plant cuticula I. Ann. of Bot. 1924, XXXVIII, S. 525.

Kutin: Sudanglyzerin (Gemisch gleicher Gewichtsteile 1proz. weingeistiger Lösung von Sudan III und Glyzerin, Erwärmen, bis der Weingeist siedet) bei dünner Kutikula Nilblausulfat oder Dimethylamidoazobenzol, für Mikrotomschnitte Baumwollrot. Zuletzt mit Weingeist auswaschen.

Kutinisierte Zellulosemembranen färben sich — ebenso wie verholzte — nach Vorbehandlung mit Javellescher Lauge u. a. mit Magdalarot (echt), Methylgrün, Solidgrün, Malachitgrün, Gentianaviolett und Fuchsin. Kisser[1]), der diese Farbstoffe empfiehlt, läßt sehr verdünnte wässerige Lösungen benützen. Eine Differenzierung kann mit Salzsäurealkohol (1 Tropfen Salzsäure auf 100 ccm Alkohol) vorgenommen werden. Man kann die Schnitte nach Auswaschen in Wasser in Glyzerin betrachten. Falls Färbung vorhanden und die Verholzungsreaktionen negativ ausgefallen sind, liegt kutinisierte Zellulose vor. Die Suberinlamelle der Korkzellen bleibt farblos.

Kisser rühmt besonders die Färbung mit Magdalarot, das nur bei sehr langer Einwirkung der Lösung eine Nachbehandlung zur Entziehung des Farbstoffüberschusses erfordert. Man wäscht zu diesem Zweck die Schnitte entweder kurz in Alkohol oder beläßt sie bis 12 Stunden in destilliertem Wasser. Die Färbungen treten auch ohne Vorbehandlung mit Javellescher Lauge ein. Die verholzten Elemente werden kräftig rotviolett gefärbt, die kutinisierten mehr rötlich, verkorkte Elemente schwach rötlich, die Kutikula und die unverholzten Elemente nicht oder ganz schwach. Beseitigung dieser schwachen Mitfärbung s. oben. Über das Verhalten von Kutinwänden gegen Farbstoffe s. auch S. 79.

Kisser hat diese Färbungen mit in Zelloidin eingebetteten Schnitten vorgenommen. Er beläßt das Zelloidin, auch wenn es von den Farbstoffen stark angefärbt wird (vgl. a. S. 884) in den Schnitten und entfernt es erst vor Einschluß in Kanadabalsam u. dgl., z. B. durch ein Gemisch gleicher Teile Alkohol und Äther, worauf dann die Schnitte in Nelkenöl kommen. Sehr kleine und zarte Schnitte befeuchtet man auf dem Objektträger gut mit 95proz. Weingeist, entfernt dann mit einem scharfen Nagel möglichst viel von dem umgebenden Zelloidin und fügt schließlich einen Tropfen Nelkenöl zu, der das Zelloidin rasch weglöst. Dann wird abgesaugt, das Nelkenöl, wenn nötig, erneuert und dann in Kanadabalsam eingeschlossen.

Tyroff[2]) weist verkorkte Membranen mit einer Gentianaviolettlösung in 70proz. Weingeist nach, der soviel 30proz. Ammoniak zu-

[1]) I. Kisser, Zur Färbung kutinisierter Zellulosemembranen. Ztschr. wiss. Mikrosk. 1928, XLV, S. 163.

[2]) H. Tyroff, Beitrag zur Kenntnis der Korkbildung in Dikotyledonenwurzeln, Diss. Frankfurt a. M. 1928. — Ref. Ztschr. wiss. Mikrosk. 1928, XLV, S. 528.

gefügt wurde, daß sie schmutzig-rosa erscheint. Man läßt die stets frisch hergestellte Lösung etwa 1 Minute auf frische Schnitte wirken, bis die ursprünglich dunkelviolette Farbe wieder auftritt. Auswaschen mit Wasser, Differenzieren mit 12½proz. Salzsäure. Verkorkte Membranen bleiben dunkelviolett, verholzte werden grün oder blaugrün.

Die Kutikula der Haare ist nach Versuchen von Czaja[1]) im Gegensatz zu älteren von Frenzel (Planta 1929, VIII, S. 642) und Göbel (Über die Durchlässigkeit der Kutikula, Diss. Leipzig 1903) für Farbstoffe impermeabel, während die darunter liegende Zellulosewand für eine große Zahl von Farbstoffen — durch Diffusion — permeabel ist. „Über die Diffusionsfähigkeit der Farbstoffe im Zellulose-Gel der Zellwand entscheidet allein die Teilchengröße der gelösten Farbstoffe. Echt gelöste und wenig kolloide Farbstoffe diffundieren, kolloidgelöste mit größeren Teilchen diffundieren nicht.

Zum indirekten Nachweis der Kutikula kann man die Berlinerblau-Reaktion heranziehen[2]). Man legt ganze Pflänzchen in Ferrichloridlösung, wäscht nach einigen Minuten aus und versetzt dann mit Ferrocyankalium und verdünnter Schwefelsäure. Es werden dann nur diejenigen Teile — bei Landpflanzen in der Regel nur die Wurzel — blau gefärbt, die keine Kutikula besitzen. Auf diese Weise wurde u. a. festgestellt, daß junge Narben allgemein eine Kutikula besitzen und sich dann nicht färben, daß aber im Laufe der Entwicklung die Kutikula teilweise abgehoben wird und daß dann Blaufärbung eintritt.

Mit diesen Verhältnissen hängen wohl auch die von Robinsohn[3]) beobachteten Färbungen zusammen. Er verwendete 1. Kaliumpermanganat verschiedener Konzentration, 2. eine filtrierte Lösung von 2,5 g Seignettesalz, 0,5 g Silbernitrat in 400 g Wasser, die auf 1 l aufgefüllt wird. Durch beide Lösungen trat Schwarzfärbung an denjenigen Stellen der Narben ein, die als Konzeptionsstellen für den Pollen bekannt sind.

Der Casparysche Streifen

Nach van Wisselingh[4]) ist der Casparysche Streifen der Endodermiszellen ein Streifen der primären Seiten- und Querwände, in dem sich Holzstoff und eine suberin- oder kutinartige Substanz abgelagert

[1]) A. Th. Czaja, Über das Verhalten der Membranen von Pflanzenhaaren zu organischen Farbstoffen, Planta 1930, X, S. 424.

[2]) L. Rosenthaler u. F. Kolle, Über die äußerste Schicht der Pflanzen. Ber. deutsch. pharmazeut. Ges. 1921, XXXI, S. 146.

[3]) I. Robinsohn, Die Färbungsreaktion der Narbe, Stigmatochromie, als morpho-biologische Blütenuntersuchungsmethode, Sitzgsber. Akad. Wiss. Math.-nat. Kl. Abt. I, 1924, CXXXIII, S. 181.

[4]) C. van Wisselingh, Beitrag zur Kenntnis der inneren Endodermis, Planta 1926, II, S. 26.

hat. Letztere ist nicht identisch mit dem Suberin des gewöhnlichen Korkgewebes.

Der Casparysche Streifen verhindert das Eindringen grober Hydrosole (Ziegenspeck)[1].

Rutheniumrot färbt die Streifen der Angiospermen, nicht die der Gymnospermen und Pteridophyten (Grund unbekannt)[2]. Nach Wodzicko[3]) wird Rutheniumrot bei Verwendung frischen Materials nicht aufgenommen; Färbung tritt nach nicht allzustarker Behandlung mit Eau de Javelle ein. Bei nachfolgender Behandlung mit Methylenblau wird dieses so reichlich aufgenommen, daß die Rotfärbung verdeckt wird. Zur besseren Sichtbarmachung der Streifen dient: Phloroglucinsalzsäure (rot), Chlorzinkjod (braun), Sudan (rötlich), Kalilauge (gelblich), ferner Chloralphenol, Methylgrünessigsäure, Anilinblau, Fuchsinjodgrün, Hämalaun[4] und Dimethylamidoazobenzol in Weingeist + Glyzerin (Gelbglyzerin, Plaut)[5]. Nach Vorbehandlung mit Eau de Javelle wird der Streifen durch Phloroglucinsalzsäure, Sudan, Chlorzinkjod u. a. nicht mehr gefärbt. Chromsäure und Schwefelsäure lösen.

Die Verholzung des Casparyschen Streifens läßt sich auch nach Vorbehandlung mit Javellescher Lauge an den Radialwänden zwischen zwei nebeneinanderliegenden Durchlaßzellen (Primär-Endodermzellen) nachweisen. Er wird also verschieden ausgebildet, je nachdem er mit Suberinlamellen in Kontakt steht oder nicht.

Von 50proz. Kalilauge wird die suberinähnliche Substanz des Casparyschen Streifens unter Bildung wasserlöslicher Verseifungsprodukte zersetzt. Nach Auswaschen mit Wasser wird der Casparysche Streifen von Jodjodkaliumlösung gelb gefärbt. Verdünnte Chromsäurelösung löst nach der Kalibehandlung den Holzstoff aus dem Casparyschen Streifen. Wird die Chromsäure zeitig ausgewaschen, so wird die Zellwand von Jodjodkalium und 66½proz. Schwefelsäure nur blau gefärbt.

---

[1] H. Ziegenspeck, Über die Rolle des Casparyschen Streifens der Endodermis und analoge Bildungen, Ber. deutsch. bot. Ges. 1921, XXXIX, S. 302.

[2] H. v. Alten, Wurzelstudien, Bot. Ztg., 1910, LXVIII, $_2$, 153.

[3] A. Wodzicko, Gibt es Unterschiede in der mikrochemischen Natur des Casparyschen Streifens bei verschiedenen Pflanzengruppen?, Act. soc. bot. Polon., 1930, VII, S. 47, nach Zeitschr. wiss. Mikrosk., 1930, XLVII, S. 407.

[4] G. Rumpf, Rhizodermis, Hypodermis, Endodermis d. Farnwurzel, Diss. Marburg 1904, Bibl. bot., 1904, Heft 62 u.: H. Müller, Metakutisierung d. Wurzelspitze u. verk. Scheid. d. Monokot.-Achsen, Bot. Ztg., 1906, LXIV, 53.

[5] Die Färbung ist noch besser, wenn man das Präparat vor Einlegen in das Reagens in Salzsäure (1 : 300) wäscht. Das Suberin wird gelb, der Casparysche Streifen rot (Mylius).

Bei Aspidium filix mas und Selaginella gelingt die Zellulosereaktion auch nach längerer Einwirkung von verdünnter Chromsäure.

Zur Aufklärung der Verhältnisse im Casparyschen Streifen verwendete Mylius[1]) mit Vorliebe die Reaktion von Roß[2]), der nacheinander Phloroglucinsalzsäure, verdünnte Alkalilauge und verdünnte Schwefelsäure einwirken läßt. Die Suberinlamelle wird gelb, der Casparysche Streifen intensiv rot.

Wachs

Membranwachs, Wachsüberzüge werden mit de Bary (Wachsüberzüge d. Epid., Bot. Ztg., 1871, XXIX, 128) als Ausscheidungen der Kutikula angesprochen. Das gebildete Wachs ist zuerst in der Kutikula (niemals in den Zellen) nachweisbar und tritt aus dieser auf die Oberfläche. Wachsschichten, die nach dem Abwischen von neuem gebildet werden können (Rizinus, Rubus biflorus, Macleya cordata, nicht bei Sedum- und Echeveria-Arten, Tittmann, Lit. S. 985 oben), wachsen durch Intussuszeption. Die klebrige Substanz der Pollinien der Asclepiadaceen soll nach Dop (Compt. rend., 1902, CXXXV, 710) Wachs sein.

Nach Pohl[3]) wird das Wachs auf der Epidermis zuerst in Form eines schmierigen oder auch flüssigen fetten Öls ausgeschieden, das erst nachher an der Luft allmählich fest wird.

de Bary unterschied drei Typen der Wachsausscheidungen: 1. Körnchenüberzug (Liliaceen, Gramineen, Cruciferen Umbelliferen, Rosaceen u. a.); 2. Stäbchenüberzug (Sorghum, Saccharum, Musa, Strelitzia); 3. Krusten (Taxus, Euphorbien, Copernicia, Ceroxylon, Myrica u. a.) Pohl (Jahrbücher f. wissensch. Bot. 1929, LXX, S. 576) teilt die Wachsüberzüge folgendermaßen ein: I. Hauptgruppe: Feste Wachsüberzüge. 1. Hauptform: Gehäufter Wachsüberzug, 2. Hauptform: Einfacher Körnchenüberzug, 3. Hauptform: Stäbchenüberzug, 4. Hauptform: Schichten oder Krustenüberzug; II. Hauptgruppe: Schmierige und flüssige Wachsüberzüge. 5. Hauptform: Schmieriger Wachsüberzug, 6. Hauptform: Flüssiger Wachsüberzug.

Wachsausscheidungen verringern die Transpirationsgröße, verhindern eine dauernde Benetzung, erschweren das Aufkriechen schädlicher Insekten; das epidermale Wachs der Myrica-Früchte dient wahrscheinlich als Anlockungsmittel für Tauben (Samenverbreitung). Die Wachsüberzüge der Blattunterseiten vieler Koniferen sollen nach Frimmel[4]) einen Lichtersparnisapparat bilden.

Pflanzenwachse sind Ester der Fettsäuren mit höheren Alkoholen. Auch die Ätholide, polypeptidartige Ester höherer Oxyfettsäuren gehören hierher.

---

[1]) G. Mylius, Das Polyderm, Inaug.-Diss. Marburg 1912.

[2]) H. Roß, Contributioni alla conoscenza del periderma, Malpighia 1890, III. S. 513; IV, S. 83.

[3]) F. Pohl, Über die physikalische Beschaffenheit des Wachses bei seinem Erscheinen auf der Epidermis, Planta 1928, VI, S. 526.

[4]) F. v. Frimmel, Die untere Kutikula des Taxusblattes — ein Lichtreflektor, Östr. bot. Ztg. 1911, LXI, S. 216.

Die epidermalen Wachse, seien es Körner, Stäbchen oder Schichten, sind im polarisierten Lichte stark doppelbrechend (Wiesner[1]). Die Wachskrusten der Kutikula von Euphorbia canariensis geben das Achsenbild eines positiven einachsigen Kristalls (Ambronn). Die Präparation kann man sich bei verschiedenen Reaktionen durch Benutzung von Flächenschnitten erleichtern. Die Körnerschicht zeigt in Flächenansicht kleine Körnchen, die Stäbchenschicht feine, meist gekrümmte Stäbchen, die homogene Krustenschicht oft Quer- und Längsrisse, wodurch sie gefeldert erscheint (die Felder erstrecken sich über ganze Zellkomplexe). Um bei der Herstellung von Querschnitten die Stäbchenschicht nicht zu verletzen, muß man die Objekte freischneiden, oder sie nur auf einer Seite an Holundermark anlegen. Da Wachs von Wasser nicht benetzt wird, von dicht stehenden Stäbchen überdies Luft zurückgehalten wird, so beobachtet man in 70—90proz. Weingeist. Fügt man den Präparaten weingeistige Farbstofflösungen von Fuchsin, Sudan III, Alkannin zu, dann färben sich die Wachsausscheidungen. Allerdings findet zugleich eine Färbung der Kutikula statt, doch sind stets Farbendifferenzen wahrnehmbar. Beim Erhitzen der in Wasser liegenden Präparate schmilzt Wachs infolge seines niedrigen Schmelzpunktes zu Tropfen zusammen. In Schnitten, die mit Fettfarbstoffen (in 50proz. Weingeist) gefärbt sind, speichern die zusammenschmelzenden Wachstropfen die Farbstoffe. Verkorkte Membranen (Aloe verrucosa) und mächtige kutinisierte Schichten enthalten bisweilen Wachs eingelagert, so daß es nicht ohne weiteres sichtbar ist. Um es sichtbar zu machen, erwärmt man die Präparate unter Deckglas bis nahe zum Sieden, wodurch das Wachs in Tröpfchen heraustritt. Hierbei läßt sich (de Bary) zeigen, daß sich das Wachs an dem Aufbau der betreffenden Membranen beteiligt. Der Durchmesser der Membran wird gemessen. Alsdann werden die Präparate in Weingeist einige Zeit gekocht. Beim nachfolgenden Messen zeigen die Membranen eine Abnahme des Durchmessers, die durch das extrahierte Wachs bedingt ist.

Die Membranwachse sind unter Deckglas im allgemeinen in Weingeist schwer löslich. Weingeist löst meist nur Anteile heraus, auch wenn größere Mengen zur Wirkung kommen (Fig. 188). Äther und Chloroform sind bessere Lösungsmittel. Orientierende Untersuchungen hatten folgende Ergebnisse: Sämtliche bis jetzt untersuchten Pflanzenwachse liefern kristallinische Sublimate (Tunmann, Nat. Vers. Karlsruhe 1911). Schabt man vorsichtig, ohne Membranteile abzuschneiden, eine Spur

[1]) J. Wiesner, Beobachtungen über die Wachsüberzüge der Epidermis, Bot. Ztg., 1871, XXIX, S. 769 u.: Über die kristallinische Beschaffenheit der geformten Wachsüberzüge pflanzlicher Oberhäute, Bot. Ztg., 1876, XXXIV, 225.

(wenige mg) des Reifes der Pflaume oder von dem Stengel von Foeniculum ab und sublimiert man dieselbe, so erhält man bereits deutliche Sublimate. Im allgemeinen besteht das erste Sublimat (etwa bei 150⁰ erhalten) bei allen Wachsen aus isoliert liegenden Stäbchen, die oft gekrümmt sind. Bei höherer Temperatur erhaltene Sublimate führen Sphärokristalle oder Rosetten, die drusenförmig bei gekreuzten Nicols erscheinen, wobei übrigens alle Bildungen silbergrau aufleuchten (Fig. 189). Die Kristalle sind stets in Äther oder in Chloroform löslich, reagieren nicht mit Osmiumsäure, die des Wachses der Pflaume geben mit Chloroformschwefelsäure keine Rotfärbung (Phytosterine fehlen), sind in Kalilauge unlöslich, in Essigsäureanhydrid (kalt) schwer löslich, bei Erwärmen leicht löslich; sie lösen sich auch in Kalilauge-Ammoniak,

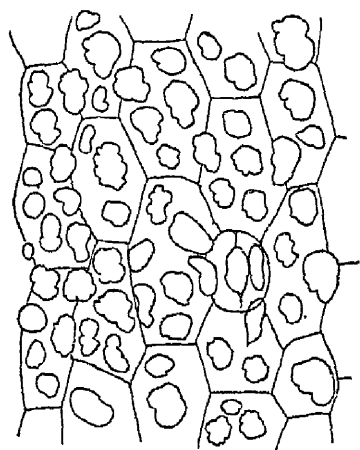



Fig. 188. Aloe (Blatt, Flächenansicht); durch absoluten Alkohol sind Anteile des Wachses herausgelöst, die unlöslichen Anteile bilden sphärokristallinische Massen (Tunmann)

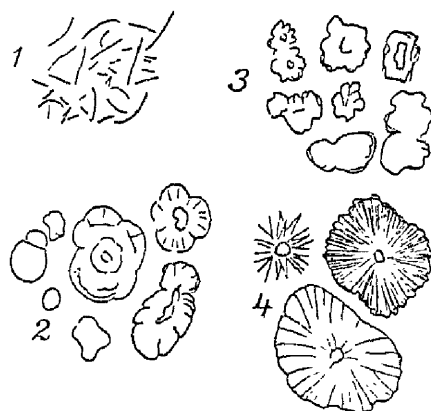



Fig. 189. Kristallformen im Mikrosublimat der Pflanzenwachse. *1* Copernicia cerifera (Handelspulver, bei 150⁰ erhalten), *2* Iris germanica, *3* Picea pungens glauca, *4* Copernicia cerifera (Droge, Stücke, bei 200⁰) (Tunmann)

doch ohne Myelinbildung. — Die Myelinbildung scheint nach den bisherigen Befunden zur Unterscheidung der Wachse von den Fetten geeignet zu sein. Konzentrierte Kalilauge-Ammoniak wirkt in der Kälte unter Deckglas nur wenig ein; durch Erwärmen mit gesättigten weingeistigen Laugen (s. S. 257) tritt Verseifung rasch ein. Copernicia (Droge) zeigt innerhalb 24 Stunden keine Seifenbildung. Erst beim Erhitzen in der Lauge scheiden sich schaumige Tropfen ab, die bei gekreuzten Nicols stark aufleuchten und zum Teil sehr feine Nädelchen erkennen lassen. Die Wachse lassen sich weit schwerer verseifen als die Fette und die Eigenschaft tritt beim Arbeiten am Objektträger noch schärfer als in der Chemie hervor. — Mit Kupferazetat konnte am Objektträger (auch beim Erhitzen) keine Reaktion erhalten werden.

Chitin

Chitin ist ein stickstoffhaltiges Polysaccharid. Bergmann, Zervas und Silberkweit gelang es, aus Krebs-Chitin ein Disaccharid des Glukosamins (Chitobiose) zu erhalten (Naturwissensch. 1931, XIX, S. 20). Reines Chitin zeigt keine Eiweißreaktionen, wird von verdünnten Säuren und alkoholischer Kalilauge angegriffen. Beim Erhitzen mit 50proz. Kalilauge auf 160—170° bildet sich Chitosan, daneben Essigsäure und Ammoniak. Chitosan enthält über 7% Stickstoff, ist löslich in verdünnter Salzsäure und verdünnter Essigsäure, fast unlöslich in verdünnter Schwefelsäure, gibt mit verdünnter Jodschwefelsäure Violettfärbung und entfärbt eine verdünnte Jodstärkelösung. Chitin kommt als hautbildende Substanz vielfach bei niederen Tieren (Insekten. Crustaceen, Mollusken) vor. In der Pilzmembran hatten Lassaigne, Payen (1843) u. a. bereits Stickstoff ermittelt und Gilson und Winterstein[1]) fanden in der Membran der Pilze Chitin. (Nach Ilkewitsch [Bull. Acad. Pétersb., 1908, 571] sollte in der Pilzmembran weder Zellulose noch Chitin zugegen sein!) Es ist nicht ausgeschlossen, daß Chitin in Bindung mit einem Kohlenhydrat vorliegt. Diese Annahme würde verschiedene Widersprüche der mikrochemischen Befunde erklären. Auch sei erwähnt, daß C. Reuter (Z. Kenntn. d. stickstoffhalt. Bestandt. d. Pilze, Diss. Zürich 1912. Ztschr. physiol. Chem., 1912, LXXVIII) aus Boletus edulis und zwar aus dem, nach Behandeln mit Äther (Fett, Phytosterin), Alkohol (Trehalose, Zucker, Basen) und Wasser (Glykogen, Zucker, Basen) verbleibenden Rückstand neben 6% Chitin noch 10% amorphes Kohlenhydrat erhielt.

Nach Dous und Ziegenspeck[2]) ist das tierische Chitin nicht identisch mit dem Pilzchitin (von Ilkewitsch Mycetin genannt). Ersteres baut sich auf Chitose und deren Amid auf, letzteres auf einer noch nicht bekannten Methylpentose und deren Amid.

Chitin ist im Pflanzenreich für die Euthallophyten allein charakteristisch. Bei den Myxomyceten besteht die Membran von Plasmodiophora Brassicae Woronin aus Chitin. Bei den Bakterien fehlt Chitin (v. Wisselingh)[3]).

Bei den Ascomyceten und Basidiomyceten tritt es beherrschend hervor; unter den Phycomyceten haben die Zygomyceten Chitin, die Oomyceten Zellulosemembranen.

Chitin und Zellulose schließen sich gegenseitig aus (v. Wettstein)[4]).

---

[1]) Ausführliche Literatur bei E. Winterstein, Ztschr. physiol. Chem., 1894, XIX S. 521; Zellner, Chemie d. höheren Pilze, S. 123; D. H. Wester, Studien über das Chitin, Diss., Bern 1909, Arch. d. Pharmazie, 1909, CCXLVII, S. 282.

[2]) Dous u. Ziegenspeck, Das Chitin der Pilze, Arch. d. Pharmazie 1926. CCLXIV, S. 751.

[3]) C. van Wisselingh, Over het onderzoek naar het voorkommen van chitine en cellulose bij bacteriën Pharmac. Weekbl. 1916, No. 33 u. 34. Ref. Ztschr. wiss. Mikrosk. 1916, XXXIII, S. 199.

[4]) F. v. Wettstein, Das Vorkommen von Chitin und seine Verwertung als systematisch-phylogenetisches Merkmal im Pflanzenreiche, Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien, Math. naturw. Kl., Abt. I, 1921, S. 130.

In Membranen und Scheiden von Cyanophyceen und in einer Anzahl Mycomyceten fand Cihlar[1]) kein Chitin; nur im Kapillitium von Stemonitis fusca war es nachzuweisen.

Weiteres über die Verbreitung des Chitins s. C. van Wisselingh in Linsbauers Handbuch der Pflanzenanatomie Bd. III, 2, Die Zellmembran, S. 186.

Bei Prüfung von Bakterien aus Agarkulturen ist zu beachten, daß Agar bei dieser Behandlung Reste zurückläßt, die sich wie Chitin verhalten.

Chitinmembranen werden vom Magensafte nicht verdaut; sie finden sich in den Faeces. Hierauf gründete J. Strasburger (Zentralbl. f. Gynäkol., 1907) den Nachweis des Mutterkorns bei Abortus. Es scheint aber ein chitinlösendes Enzym zu geben, denn die Membranen der endotrophen Mykorrhizen (Peronosporeen) von Podocarpus, die nach K. Shibata (Cyt. Stud. endotroph. Mykorrhiz., Jahrb. wiss. Bot., 1902, XXXVII, 643) Chitin führen, werden verdaut.

Bereits den älteren Forschern war es aufgefallen, daß die Membranen der Pilze andere Reaktionen zeigen, als die Zellulosewände der höheren Pflanzen. Die Pilzmembran ist gegen Säuren und Alkalien sehr resistent, gibt mit Jodschwefelsäure oder mit Chlorzinkjod eine gelbe bis braune Färbung und ist unlöslich in Kupferoxydammoniak. de Bary[2]) bezeichnete den membranbildenden Stoff als Pilzzellulose, zumal nach längerer Einwirkung von verdünnter Kalilauge „Zellulosereaktionen" zu erzielen waren und Richter[3]) hat bei einer großen Anzahl von Pilzen nach langer Alkalibehandlung (einige Wochen) ebenfalls „Zellulosereaktionen" erhalten. Doch zeigte Gilson[4]), daß es sich um einen besonderen Membranstoff handelte (Mykosin), der sich mit Jodjodkaliumlösung, die eine Spur Säure enthält, rosaviolett färbt.

Nachdem nun das Auftreten von Chitin in den Pilzmembranen makrochemisch erwiesen ist, wissen wir, daß die nach der Alkalibehandlung zu erzielende vermeintliche Zellulosereaktion mit Jodschwefelsäure dem Chitosan zukommt, welches aus dem Chitin durch die Lauge gebildet wird. Hierauf hat van Wisselingh (Lit. S. 910, 1) den mikrochemischen Nachweis gegründet. Die Präparate werden zur Überführung in Chitosan in 60proz. Kalilauge[5]) in kleinen zugeschmolzenen

---

[1]) C. Cihlar, Ref. Bot. Centralbl., 1916, CXXXI, S. 524.

[2]) A. de Bary, Morph. u. Biol. d. Pilze, 1884, S. 9.

[3]) K. Richter, Beitr. z. gen. Kenntn. d. chem. Beschaff. d. Zellmembran bei d. Pilzen, Sitzgsb. Wien Ak., 1881, LXXXIII, $_1$, S. 494.

[4]) E. Gilson, Rech. sur la membrane cellulaire des champignons, La Cellule, 1894, XI, S. 5 und: De la présence de la chitine dans la membr. cell. des champignons, Compt. rend., 1895, CXX, S. 1000.

[5]) Nimmt man nur einen kleinen Tropfen Kalilauge, so kann man das Verdünnen mit Alkohol und das Auswaschen mit Wasser unter Benutzung der Zentrifuge in dem Glasröhrchen selbst vornehmen. Zuletzt untersucht man mit Jodjodkalium und sehr verdünnter Schwefelsäure auf dem Objektträger.

und mit Kupfermänteln geschützten Glasröhrchen von 7 mm Durchmesser im Ölbade etwa 20 Minuten lang auf 160° erhitzt (Apparat Fig. 190). Nach dem Erkalten des Ölbades werden die Glasröhrchen geöffnet und die Präparate wiederholt mit absolutem oder 95proz. Alkohol ausgewaschen, wodurch sie (durch Härtung) vor dem Zerfall bewahrt werden. Nun werden sie einige Stunden vorsichtig mit Wasser ausgewaschen, alsdann gelangen sie auf den Objektträger und unter Deckglas wird 0,5proz. Jodlösung (Jodjodkalium) durchgesaugt. Nachfolgender Zusatz von 1proz. Schwefelsäure bedingt Violettfärbung[1]). 3proz. Essigsäure, unter Deckglas zugesetzt, löst die Präparate mehr oder weniger völlig auf. Membranfarbstoffe, die die Violettfärbung der Jodschwefelsäure verdecken können, entfernt man zuvor mit verdünnter Chromsäure. Das Isolichenin der Flechtenpilze, welches mit Jod ebenfalls blau wird, muß aus den Schnitten zuvor durch Erhitzen mit Glyzerin auf 300° (im zugeschmolzenen Rohr) entfernt werden. Mit der Zellulose teilt Chitin die Eigenschaft, sich beim Erhitzen in Glyzerin auf 300° nicht zu verändern. „Läßt eine Zellwand bei Erwärmung in Glyzerin keinen Überrest zurück, so ist dies ein Beweis, daß dieselbe kein Chitin und auch keine Zellulose enthält" (van Wisselingh, l. c. S. 643).

Fig. 190. Apparat zum Chitinnachweis nach van Wisselingh-Wester. Die Schnitte kommen mit der Lauge in das an beiden Enden zugeschmolzene Glasröhrchen (R); dieses, durch einen Kupferdrahtmantel (B) geschützt, wird mittels des gebogenen Kupferdrahtes (K) durch eine Öffnung des Deckels (D) in das Ölbad (G) eingehängt

Die Ölbadmethode erscheint auf den ersten Blick umständlich. Sie ist aber recht einfach, wenn man sich erst mit der nötigen Apparatur versehen hat und verlangt nur ein vorsichtiges Umgehen der mit der Lauge behandelten Präparate. Die Färbungen der Chitosanreaktion fallen selbst an dem gleichen Präparate verschieden aus (von Schwarz-, Rot- bis Braunviolett). Es erscheint aber fraglich, ob man hierfür mit Kindermann[2])

[1]) Setzt man nachträglich $66\frac{1}{2}$—76proz. Schwefelsäure zu, so verschwindet die violette Chitosanreaktion, während die Zellulose gebläut wird (van Wisselingh). Nimmt man statt Schwefelsäure Kaliumsulfatlösung, so entsteht eine blauviolette Färbung.

[2]) Kindermann, Die Fruchtkörper von Stereum sanguinolentum, Österr. bot. Ztschr., 1901, LI, S. 32.

einen verschieden hohen Chitingehalt verantwortlich machen kann, zumal viel von der Dauer der Laugenbehandlung und von dem Material abhängt. Bei sehr vielen Pilzen wurde die Chitosanreaktion von van Wisselingh ausgeführt und von Wester an vielen tierischen und pflanzlichen Objekten.

Man kann sich das umständliche Einschlußverfahren dadurch ersparen, daß man die Gegenstände im Becherglas in siedender gesättigter Kalilauge 20—30 Minuten hält (Vouk)[1].

Die von Vouk empfohlene Modifikation der van Wisselinghschen Probe ist nach v. Wittstein bei gröberen Objekten sehr gut durchführbar, feinere werden aber so zerstört, daß eine Orientierung nicht mehr möglich ist.

van Wisselingh sieht in keiner Abänderung eine Verbesserung seines Verfahrens.

Schulze[2]) ersetzt das van Wisselinghsche Verfahren dadurch, daß er mit 33proz. Kalilauge am Rückflußkühler etwa 1 Stunde bei 155—160° erhitzt. Als Bad dient Phthalester oder Glyzerin.

Schulze hat dann weiter festgestellt, daß Chitin nach 24stündiger Vorbehandlung mit verdünntem (womit? und wie stark) Acetylbromid nach Einlegen in Jod + 2proz. Schwefelsäure kirschrot, dann violett wird; auf Zusatz konzentrierter Schwefelsäure tritt dann blaue Färbung ein. Die Vorbehandlung mit Acetylbromid bietet nach Kühnelt keinen Vorteil gegenüber dem Wisselinghschen Verfahren.

Schulze gibt dann noch ein Verfahren zum Nachweis des Chitins an, das wohl mehr für tierische Objekte bestimmt ist, aber der Vollständigkeit halber wiedergegeben sei: Das zu untersuchende Objekt kommt in fest schließendem Gefäß im Dunkeln in Chlordioxydessigsäure (Diaphanol E. Leitz, Berlin, Luisenstr. 45) bis zur völligen Bleichung (am besten auf jeden Fall 24 Stunden). Nach gutem Auswaschen wird das Präparat mit Chlorzinkjod betupft. Bei Vorhandensein von Chitin deutliche Violettfärbung — besonders deutlich oft erst nach Abspülen mit Wasser.

Um einer etwaigen Verwechslung mit Zellulose (oder Tunicin) vorzubeugen, behandelt man ein zweites Stückchen des Objektes mit Jodkalium und konzentrierter Schwefelsäure, worauf bei Zellulose (und Tunicin) sofort eine Blaufärbung eintritt, während beim Chitin das Jodbraun sich nur verstärkt.

Bei der Einwirkung von Diaphanol wird nach Kühnelt Chlor absorbiert; bei der folgenden Einwirkung jodidhaltiger Reagentien wird Jod in Freiheit gesetzt und unabhängig von der chemischen Beschaffenheit des Substrates mit brauner oder violetter Farbe gespeichert. Will man die Diaphanol-Chlorzinkjodmethode

---

[1]) V. Vouk, Zur Kenntnis der mikrochemischen Chitinreaktion, Ber. deutsch. bot. Ges. 1915, XXXIII, S. 413.

[2]) P. Schulze, Die Beziehungen zwischen pflanzlichen und tierischen Skelettsubstanzen und über Chitinreaktionen, Biolog. Zentralbl. 1921, XLII, S. 388.

benützen, so muß man deshalb das adsorbierte Chlor erst durch Kochen mit Natriumthiosulfatlösung unschädlich machen.

Auch andere Jodreagentien reagieren mit Chitin, sind jedoch nicht so brauchbar wie die obenerwähnte schwache Jodschwefelsäure. „Nach Behandlung mit Jodjodkaliumlösung werden Chitinmembranen durch eine schwache Chlorzinklösung rötlichviolett gefärbt; Hinzufügung einer stärkeren Chlorzinklösung, z. B. eine, welche 40, 50 oder 60% Chlorzink enthält, bewirkt eine blauviolette oder blaue Verfärbung, eine noch stärkere (70%) Entfärbung" (van Wisselingh). Und Benecke[1]) zeigte, daß Chitin mit konzentriertem Chlorzinkjod behandelt, sich bei nachfolgendem Zusatz von größeren Wassermengen violett färbt. Die Violettfärbung kommt dem Chitin und nicht Abbauprodukten zu (Kühnelt).

Außer der Reaktion mit Jod-Schwefelsäure können nach v. Wisselingh[2]) noch folgende Reaktionen zum Nachweis des Chitosans benützt werden.

1. Die Chitosanpräparate kommen erst in verdünnte Schwefelsäure, dann in 1proz. Kaliumferrocyanid, werden dann mit Wasser ausgewaschen und ausgekocht. Nach Eintragen in die Lösung eines Ferrisalzes (Eisenalaun) entsteht in den ursprünglich chitinhaltigen Teilen ein feiner, gut lokalisierter Niederschlag von Berlinerblau. Wendet man zuerst Ferricyankalium und zuletzt Ferroammoniumsulfat an, so erhält man einen Niederschlag von Turnbullsblau.
2. Pikrinsäure, Trinitrokresol und Pikrolonsäure färben Chitosan (nicht Chitin) gelb.
3. Man legt die Präparate in eine 1proz. Lösung von Phosphormolybdänsäure, wäscht und kocht mit destilliertem Wasser gründlich aus und legt sie dann in sehr verdünnte Zinnchlorürlösung: Blaufärbung der chitosanhaltigen Elemente.
4. Man erwärmt die Präparate schwach mit einer Lösung (Stärke?) von 1, 2-Naphthochinon-4-sulfosaurem Natrium in sehr verdünnter Essigsäure: Zimtbraune Färbung, die mit verdünnter Kalilauge oder Ammoniak nach olivgrün umschlägt.

Zur Kontrolle legt man die Chitosanpräparate auf einem Objektträger in 2proz. Essigsäure. Fügt man dann unter dem Deckglas Ferro- oder Ferricyanwasserstoffsäure, Phosphormolybdänsäure, Pikrin- oder Pikrolonsäure oder naphthochinonsulfosaures Natrium zu, so entstehen Niederschläge, die man zu den unter 1—4 angegebenen Reaktionen verwenden kann.

---

[1]) W. Benecke, Bot. Ztg., 1905, LXIII, S. 227. — Chlorzinkjodlösung nach Benecke: Eine Lösung von 1,6 g Jod und 10 g Kaliumjodid in 14 g Wasser wird mit einer Lösung von 60 g Zinkchlorid in 14 g Wasser gemischt. Nach dem Erkalten wird durch Glaswolle filtriert.

[2]) C. van Wisselingh, Über die Anwendung der in der organischen Chemie gebräuchlichen Reaktionen bei der phytomikrochemischen Untersuchung, Folia microbiologica 1915, III, S. 31; Ref. Ztschr. wiss. Mikrosk. 1915, XXXII, S. 341.

Nach v. Wettstein sind von diesen Reaktionen besonders wertvoll die unter 1., 2. und 4. aufgeführten.

Man kann nach Brunswik[1]) das Chitin auf folgende Weise in kristallinische Chitosansalze überführen:

Die chitinhaltigen Gegenstände werden in der üblichen Weise 15 Minuten mit 50proz. Kalilauge auf 160° erhitzt; das so gebildete Chitosan wird mit Weingeist und Wasser von der Lauge gereinigt. Dann bringt man die Proben auf dem Objektträger in 50proz. Salpetersäure, 10proz. Schwefelsäure oder 1proz. Chromsäure, erwärmt vorsichtig zum Kochen und läßt äußerst langsam abkühlen. Man erhält so die entsprechenden Chitosansalze in Form charakteristischer Sphärokristalle. Bei Anwendung von Schwefelsäure kann man die Jodreaktion damit verbinden, indem man erst in eine ½—1proz. Jodjodkaliumlösung und dann in 10proz. Schwefelsäure legt. Beim weiteren Behandeln in der oben beschriebenen Weise erhält man dann unter Entfärbung die Kristalle des Chitosansulfats.

Die Chitosansalzsphärokristalle lassen sich mit einer Anzahl von Farbstoffen färben, so mit Kongorot, Orange G, Säurefuchsin, Anilinblau, wasserlöslichem Nigrosin.

Auf den Verfahren von van Wisselingh und Brunswik beruht folgende Vorschrift Kühnelts[2]), die wohl in erster Linie für tierische Gegenstände bestimmt ist.

Stark inkrustierte und gefärbte Gegenstände werden mit Glyzerin auf 300° erhitzt oder mit Salzsäure und Kaliumchlorat gebleicht (bei schwacher Inkrustierung unnötig), hierauf werden sie in zugeschmolzenen Röhren mit 50proz. Kalilauge im Sandbad 15—30 Minuten auf 160—180° erhitzt. Man wäscht nach dem Erkalten den Inhalt der Röhren am besten durch Zentrifugieren in ihnen mit Weingeist und Wasser. Das so erhaltene Chitosan wird auf dem Objektträger mit Jodjodkaliumlösung (J 2 g, KJ 1 g, Wasser 200 g) versetzt und diese durch 10proz. Schwefelsäure verdrängt. Dunkelviolette Färbung beweist die Anwesenheit von Chitosan. Zur Kontrolle erhitzt man das Präparat auf dem Objektträger bis zur vollständigen Auflösung des Chitosans und läßt in einem auf 70° angeheizten Thermostaten oder Sandbad erkalten. Es entstehen durch Jod violettgefärbte Sphärite von Chitosansulfat, die zwischen gekreuzten Nikols das Brewstersche Kreuz zeigen.

Nach Wittlin (Lit. S. 815, 3) sollen die Raphidenhüllen der Pilzzellulose (also dem Chitin) nahestehen; sie reagieren nicht mit Jodschwefelsäure und sind durch eine Pektinsubstanz untereinander verkittet, die sich in Kaliumchlorat-Salpetersäure löst.

---

[1]) H. Brunswik, Über die Mikrochemie der Chitosanverbindungen. Biochem. Ztschr. 1921, CXIII, S. 111.

[2]) W. Kühnelt, Studien über den mikrochemischen Nachweis des Chitins. Biolog. Zentralbl. 1928, XLVIII, S. 374.

Bemerkungen über die Membran der Kryptogamen[1])

Die Ansichten über die Natur der Membranen der niederen Pflanzen stimmen noch in vielen Fällen wenig überein[2]). — Bei den **Myxomyceten** sollen die Sporangienwände und die Capillitiumfasern im jugendlichen Zustande Zellulose führen (Trichia, Lycogala, Arcyria, de Bary, Lit. S. 223, 5, Stemonitis, Comatricha, Jahn, 1899). Sie verändern sich später. Für Didymium gibt van Wisselingh (Lit. S. 910, 1) Zellulose an. — **Bakterien** führen im Gegensatz zu älteren Angaben kein Chitin (S. 998). — Bei Bacterium Xylinum und Sarcina ventriculi soll Zellulose vorhanden sein.

Die Membran der **Cyanophyceen**[3]) enthält kein Chitin. In allen Heterocysten sowie in den Scheiden aller **Scytonemataceen** und **Rivulariaceen** und der **Oscillatoriacee** Schizothrix ist Zellulose vorhanden. Pektinstoffe finden sich in den Gallerthüllen, Pentosane in der Nostocgallerte.

Diatomeen: Der nach der Entfernung der Kieselsäure mit Fluorwasserstoffsäure (S. 167) zurückbleibende Anteil der Diatomeenmembran reagiert nicht auf Zellulose. Er besteht aus Pektinsubstanzen[4]). Vor der Pektinreaktion müssen störende Stoffe entfernt werden durch 24-stündiges Behandeln mit 50proz. Salzsäure und chlorsaurem Kali. Der Rückstand wird nach Mangin durch Zentrifugieren gewaschen mit: 1. absolutem Alkohol, 2. einer sirupdicken Lösung von Kalium in Weingeist, 3. Weingeist, 4. absolutem Alkohol, alsdann kommt er in 3proz. Borsäure und wird mit Rutheniumrot gefärbt. Zum Studium werden die Zellinhalte mit Eau de Javelle und Weingeist entfernt, dann wird mit alkoholischem Methylviolett gefärbt, schließlich Nelkenöl, Balsam oder Styrax[5]).

Das Manginsche Mazerationsverfahren gelang Liebisch bei Amphitetras antediluviana Ehrbg. nicht. Nach diesem Forscher besteht deren Kieselpanzer höchstwahrscheinlich aus einer opaligen Kieselsäure ohne jeden Einschluß einer

---

[1]) Alle Angaben über die Membran der Kryptogamen, die nur auf mikrochemischen Befunden beruhen, bedürfen der Nachprüfung und sind nur mit diesem Vorbehalt wiedergegeben. Dies gilt in erster Linie für die Zellulose, da die für deren Feststellung meist herangezogene Reaktion mit Chlorzinkjod u. dgl. nicht mehr als beweisend gelten darf (vgl. S. 906).

[2]) Vgl. dazu noch die Angaben über Chitin S. 998.

[3]) G. Klein, Zur Chemie der Zellhaut der Cyanophyceen, Sitzungsber. Wien. Akad. Wiss. Math.-naturw. Kl., Abt. I, 1915, CXXIV, S. 529.

[4]) L. Mangin, Observations sur les Diatomées, Ann. sc. nat. bot. 1908, sér. IX, VIII, S. 177.

[5]) W. Benecke, Farblose Diatomeen d. Kieler Förde, Jahrb. f. wiss. Bot., 1900, XXXV, S. 535.

organischen Substanz. Darunter befindet sich eine innere organische aus Pektin bestehende Membran.

Die Pektinmembran konnte von Liebisch[1]) bei den Centrales und Pennales nachgewiesen werden. Vor Liebisch hatte bereits Frenzel[2]) festgestellt, daß bei Melosira-Fäden, die 2—8 Stunden mit Wasserdampf behandelt wurden, der Kieselpanzer gelöst wird und ein weiches Häutchen übrig bleibt.

Liebisch löst die Kieselsäure mit Flußsäure, wäscht gut mit Wasser aus und färbt mit Safranin oder Rutheniumrot.

Peridineen sollen Zellulose führen. Die Zellulosereaktion tritt (Membranleisten) erst nach Vorbehandlung mit Kalilauge oder Säuren ein. Auch Klebs (Lit. S. 910, 2) gibt für die Membran gallertbildender Algen, die mit Kongorot, konzentriertem Jodjodkalium, Chlorzinkjod und Jodschwefelsäure reagiert, Zellulose und eine „chemisch noch unbekannte" Substanz (Hemizellulose?) an, die sich mit verdünnter Salzsäure ausziehen läßt.

Bei den **Konjugaten** hat van Wisselingh stets Zellulose angetroffen.

Desmidiaceenmembran kann mit Fuchsin, Methylviolett und Bismarckbraun gefärbt werden bei Nachbehandlung mit Kaliumazetat. Die Färbungen werden an den durch Druck von den Protoplasten befreiten Zellen (lebendes Material) vorgenommen (Lütkemüller, Lit. S. 960, 1). — Die Membran der **Derbesien** besteht aus zwei Substanzen, die sich durch konzentrierte Schwefelsäure voneinander unterscheiden lassen und besonders deutlich bei nachfolgendem Zusatz von Chlorzinkjod hervortreten (Lit. S. 805, 1).

Nach Arbeláer[3]) hat die Membran der **Davalliaceen** Pektincharakter. Bei den Leukostegien läßt sich der Reserveschleim in der Nähe des Vegetationspunktes durch Weingeist in bäumchenartig verzweigten Formen auskristallisieren, die sich in Wasser wieder lösen.

Protococcoideen. Die Wand der Aplanosporen von Haematococcus pluvialis[4]) besteht aus einer überwiegend aus Pentosanen

---

[1]) W. Liebisch, Amphitetras antediluviana Ehrbg., sowie einige Beiträge *zum Bau und zur Entwicklung der Diatomeenzelle*, Ztschr. f. Bot. 1928, XX, S. 225. — W. Liebisch, Experimentelle und kritische Untersuchungen über die Pektinmembran der Diatomeen usw., Ztschr. f. Botanik 1929, XXII, S. 1.

[2]) Joh. Frenzel, Die Diatomeen und ihr Schicksal, Naturwissenschaftl. Wochenschr. 1897, XII, Nr. 14.

[3]) E. P. Arbeláer, Die natürliche Gruppe der Davalliaceen (Sm.) Kfs. usw., Botan. Abhdl. herausgegeben von K. Goebel, H. 14; Ref. Ztschr. wiss. Mikrosk. 1928, XLV, S. 408.

[4]) Walter Mevius, Beiträge zur Kenntnis der Farbstoffe und der Membran von Haematococcus pluvialis, Ber. deutsch.-bot. Ges. 1924, XLI, S. 237.

gebildeten Hemizellulose, die von einem kutinähnlichen Stoff inkrustiert ist. Die Quellschicht der Zoosporen gibt keine Zellulosereaktionen, geht aber aus Zellulose hervor und wird nach Bildung der Aplanosporenwand wieder in Zellulose verwandelt. Die Wände von Chlamydomonas angulosa bestehen aus Hemizellulosen und Pektin.

Siphoneen. Die marinen Siphoneen mit Ausnahme der Vaucheriaceen besitzen eine zellulosefreie aus Pektin und Callose zusammengesetzte Membran.

Pektinnachweis durch die Färbung mit Metallsalzen nach Devaux und Petit, Rutheniumrot und den Pektinsäure-Niederschlag nach Schloesing.

Nachweis der Callose durch die Tetrazofarbstoffe der Benzidingruppe, die löslichen Blaue, nach Vorbehandlung mit Lauge und die Eigenschaft, nach Vorbehandlung mit konzentrierter Kali- oder Natronlauge wasserlöslich zu werden[1]).

Die Membran von Caulerpa enthält keine Zellulose, sondern besteht aus pektin- und calloseartigen Substanzen. Die von Correns beschriebenen Kristalle bestehen aus Callose, sind aber in Schweizers Reagens löslich. Derselbe Membrantypus findet sich außer bei den Caulerpaceen bei den Bryopsidaceen, den Derbesiaceen und den Codiaceen (Mirande).

Die Vaucheriaceen besitzen eine Zellulose-Pektin-Membran. Über Callose bei den **Chlorophyceen** s. S. 916. Zellulose kommt bei ihnen häufig, aber nicht immer vor.

Die Membran der **Confervaceen** soll Pektinstoffe neben Zellulose enthalten.

Characeen[2]). Die Membran der Characeen besteht, wie nach Oltmanns ganz allgemein die der Algen aus einer äußeren, einer cuticulaähnlichen Schicht, und der eigentlichen aus Zellulose bestehenden Membran. Um letztere zu erkennen, muß man entweder die Zellen unter Chlorzinkjod oder Jod-Schwefelsäure durch Druck auf das Deckglas zerquetschen oder mit Salzsäure leicht kochen, da sich dann die äußere Schicht ablöst; auch auf Querschnitten ist die Zellulosereaktion deutlich zu erhalten. Auch die bei den Characeen auftretenden Membranverdickungen sind ebenso zusammengesetzt; die Zapfen bestehen aus reiner Zellulose.

---

[1]) R. Mirande, Sur les présence de la callose dans la membrane des Algues siphonées marines, Compt rend. Acad. sciences 1913, CLVI, S. 475.

[2]) A. Votava, Beiträge zur Kenntnis der Inhaltskörper und der Membran der Characeen, Österr. bot. Ztschr. 1914, LXIV, S. 442.

In den Zellwänden von **Phaeophyceen** kommt Zellulose vor. Außerdem findet sich in Fucus vesicul. und Sphaeroc. crisp. ein Kohlenhydrat, Fucin, das sich bei 300° in Wasser löst und sich mit Jodjodkalium und 1proz. Schwefelsäure blau färbt. Es kommt vorzüglich in der Mittellamelle vor. Setzt man einem mit 1proz. Jodschwefelsäure gefärbten Schnitt (der Blaufärbung in der Mittellamelle zeigt) 76proz. Schwefelsäure zu, dann wird die Färbung umgekehrt, die fucinhaltige Mittellamelle wird farblos, die Zelluloselamelle blau.

Weitere Membranbestandteile[1]) sind: Fukoidin, das Kalziumsalz[2]) der Fukoidinsäure. Kommt in den Schleimkanälen vor.

Wässerige Lösung wird durch Bleiessig gefällt, nicht durch Bleiazetat. Keine Färbung mit Jod.

Algin, das Kalziumsalz der Alginsäure. In Wasser unlöslich. Keine Färbung mit Jod. Löslich in Sodalösung.

Colin und Ricard fanden Algin in 12 von 15 untersuchten Braunalgen.

Vgl. dazu S. 852.

Bei den **Florideen** scheint Zellulose in der Regel, aber nicht immer, in den Membranen vorhanden.

Corallineen färbt K. Yendo (Zeitschr. wiss. Mikr., 1904, XXI, 260) nach Entkalkung mit Hämatoxylin-Fuchsin. Die Genicula-Membran besteht aus Gelose und Zellulose, erstere muß vor der Zellulosereaktion entfernt werden.

Die in Wasser übergehenden Kohlenhydrate von Chondrus crispus und Ceramium rubrum sind darin in Form von Kalzium- und Ammoniumsalzen von Estersäuren der Schwefelsäure enthalten[3]).

Membranen der Pilze

Bei einigen Peronosporeen und Saprolegniaceen glaubt van Wisselingh Zellulose nachgewiesen zu haben.

Die Membranen der höheren Pilze können Chitin, Zellulose, Hemizellulosen, vielleicht auch Callose und wohl noch weitere Polysaccharide enthalten.

Die Capillitiumfasern einiger Bovistaarten werden mit Phloroglucinsalzsäure rot. Die reagierende Substanz hält Harz[4]) für Lignin doch soll sie sich in Kalilauge und in Natronlauge langsam lösen.

---

[1]) H. Kylin, Untersuchungen über die Biochemie der Meeresalgen, Ztschr. physiol. Chem. 1915, XCIV, S. 404ff.

[2]) Nach Giral sind noch andere Kationen im Algin vorhanden, Chem. Zentralbl. 1930, I, S. 697.

[3]) B. Russell-Wells, Biochem. Journ. 1922, XVI, S. 578.

[4]) O. Harz, Lignin in Pilzmembr., Bot. Centralbl. 1886, XXV, S. 386.

Schussnig und Becker[1]) fanden eine Hemizellulose in den Hyphen und Asci von Ascomyceten.

Nach Einwirkung von 80proz. Kalilauge bei 110° gaben Hyphen und Asci violette oder blaue Färbungen mit den Jodreagentien. Die nach van Wisselingh (s. S. 1000) bei 300° gereinigten Präparate zerflossen sofort durch konzentrierte Salz-, Schwefel- oder Salpetersäure. Nicht vorbehandelte Präparate sind widerstandsfähiger.

Kupferoxydammoniak löst aus den Ascus-Membranen die sich — nach Einwirkung von Säuren — mit Jodreagenzien bläuenden Substanzen auch nach 30tägiger Einwirkungsdauer nicht auf.

Kongorot färbt aus neutralem und alkalischem Bad alle Teile des Präparats in kurzer Zeit, Benzoazurin färbt im neutralen und alkalischen Bade die Hyphen sofort blau, die Asci erst nach längerer Einwirkungsdauer. Safranin, Fuchsin und Methylenblau färben im neutralen Bade.

Bei allen Färbungen werden die Hyphen viel rascher und intensiver gefärbt als die Asci.

Zum Nachweis der Pilzhyphen im Gewebe der Wirtspflanzen werden verschiedene Farbstoffe verwendet: 1proz. Safranin + 1proz. Lichtgrün (Colley für Cronartium), Benzolblau mit Benzoazurin und Rosazurin (Mangin für Peronosporaceen), Bayrischblau-Orange und Flemmings Dreifarbengemisch (Wartenweiler), Kongorot nach Vorbehandlung mit Eau de Javelle (Klebahn und Phillip). Lepik[2]) empfiehlt folgendes Verfahren: 1. 10—15 Minuten Aufhellen in Laktophenol-Alkohol (wasserfreies Phenol 10 g, konzentrierte Milchsäure 10 ccm, eingedicktes Glyzerin 20 ccm, 96proz. Alkohol 20 ccm). 2. Zwei Stunden färben mit Kottonblau 4 B 0,02 g Safranin 0,10 g Laktophenol-Alkohol 100 ccm. 3. Differenzieren unter dem Mikroskop; Überfärbungen durch Laktophenol-Alkohol beseitigen. 4. Waschen in absolutem Alkohol. 5. 20—30 Minuten in schwache Lösung von Safranin in Nelkenöl. 6. Differenzieren unter dem Mikroskop in reinem Nelkenöl. 7. Xylol, dann Balsam.

Kobel[3]) legte die Schnitte fünf Minuten in eine Lösung von 0,1 g Anilinblau in 50 ccm konzentrierter Milchsäure und 100 ccm Wasser, spült mit Wasser ab und erwärmt in einem Tropfen Milchsäure auf dem Objektträger. Die Hyphen und besonders die Haustorien nehmen den Farbstoff intensiv auf, die Gewebe der Wirtspflanze bleiben fast farblos.

Mangin färbt nach Vorbehandlung mit Javellescher Lauge mit einem Gemisch von Anilinblau und Orsellin BB oder Vesuvin, das das Pilzmycel blau, die Zellwände der Wirtspflanze rot färbt.

---

[1]) B. Schussnig und S. Becker, Mikrochemische Untersuchung der Ascusmembran als ein Beitrag zur Phylogenie des Ascus, Planta 1927, IV, S. 572.

[2]) E. Lepik, Differential staining of Peronosporaceae, Phytopathology 1928, XVIII, S. 869; Ref. in Ztschr. wiss. Mikroskopie 1929, XLVI, S. 161.

[3]) F. Kobel, Ein neues Färbverfahren für parasitische Pilzmyzelien, Mitteil. d. naturforsch. Ges., Bern 1919, S. XLIV.

Stoughton[1]) färbt mit einer Lösung von 0,1 g Thionin in 100 ccm 5proz. Karbolwasser und nach Behandlung mit Weingeist mit gesättigter weingeistiger Lösung von Orange G. Die Parasiten (Puccinia malvacearum) färben sich rotviolett, die Zellulosewände gelb oder grün, verholzte Elemente blau, Zellkerne hellblau, Mikroben rot.

Ferner sei noch verwiesen auf: G. Unna jr. und W Fey, Über Färbung von Fadenpilzen (in Hautschnitten), Ztschr. wiss. Mikrosk. 1929, XLVI, S. 289.

Bei den **Membranstoffen der Flechten**[2]) ist von vornherein zwischen denen der Flechtenpilze und denen der Gonidien zu unterscheiden.

Die Membranstoffe der Flechtenpilze entsprechen i. A. denen der nahestehenden freilebenden Arten; die jugendlichen enthalten Zellulose, die älteren Chitin, das aber in manchen (Cetraria islandica, C. nivalis) auch fehlen kann. Über Lichenin und Isolichenin s. S. 927.

Im Hymenium vieler Flechten kommt ein amyloidartiger Stoff vor, der in kaltem und warmem Wasser unlöslich, in konzentrierter Salzsäure und Schweizers Reagens langsam löslich ist und sich auch in Glyzerin bei 270° löst. Mit Jod nimmt er je nach der Konzentration der Jodlösung verschiedene Färbung an; mit 0,22proz. Jodlösung entsteht eine bleibende Blaufärbung.

Zweifelhafte Stoffe sind Usnin (Usnein) in Usnea barbata (van Wisselingh), das mit Jod + Schwefelsäure rotviolett wird und sich in Glyzerin von 300° löst und das in kochendem Wasser lösliche Everniin aus Evernia prunastri (Stuede)[3]).

Die Membran der chlorophyllgrünen Gonidien besteht aus Zellulose, die der blaugrünen Gonidien scheint mit der der freilebenden Algen übereinzustimmen. In vielen Fällen umgibt eine Pektinschicht eine dem Plasma anliegende Zellulosemembran.

Die Wände der **Moose** bestehen teils aus Zellulose und Pektinen, teils aus Estern dieser Körper mit Dicranumgerbsäure und Sphagnol. Holz fehlt, denn auch die mechanischen Elemente geben nach Vorbehandlung mit warmer Kalilauge Zellulosereaktion. Die Membranen des Protonema und der meisten Lebermoose reagieren ohne weiteres

[1]) R. H. Stoughton, Thionin and orange G for the differential staining of bacteria and fungi in plant tissues, Ann. appl. biol., 1930, XVII, S. 162, nach Ztschr. wiss. Mikrosk., 1930, XLVII, S. 409.

[2]) F. Tobler, Biologie der Flechten (Berlin 1925, Gebr. Borntraeger), S. 111. — E. Mameli, Ricerche fisiologiche sui licheni I Idrati di carbonio, Atti dell Ist. Bot. d. R., Univ. di Pavia, N. S., 1919, XVII, S. 147.

[3]) Fr. Stuede, Über Everniin, Pektin und eine neue glykogene Substanz, Liebigs Annal. d. Chem. 1864, CXXXI, S. 241.

mit Jod auf Zellulose[1]). Die Wände der Laubmoose werden mit Kalilauge gelb, mit Ferrichlorid blau- bis grünschwarz[2]). Der die Eisenreaktion gebende Körper, Dicranumgerbsäure, kann durch stark verdünnte Alkalien, aber nicht durch kochendes Wasser entfernt werden und liegt jedenfalls in esterartiger Bindung vor (Leucobryum, Gottschea, Mastigobryum). Viele Moosmembranen (Sphagnum, Fontinalis, Trichocolea, Hypnaceen) werden durch Ferrichlorid rotbraun, durch Millon kirschrot. Den diese Reaktionen gebenden Stoff nannte Czapek[3]) Sphagnol; er löst sich in Alkalien, ist stickstofffrei und kristallisiert. Auch dieser Stoff kann in esterartiger Bindung vorliegen, denn nach Vorbehandlung mit Schultzeschem Gemisch, verdünnter Chromsäure oder nach Kochen mit verdünnten Alkalien erhält man typische Zellulosereaktionen. Sphagnol und Dicranumgerbsäure können sich gegenseitig vertreten oder gleichzeitig vorkommen. Mit Rutheniumrot hat Gjokié verschiedentlich (Sphagnum) Pektinreaktion erhalten und auch Czapek fand Pektine, die sich mit starker Natronlauge ausziehen lassen. Die bei Gelegenheit anderer Untersuchungen vorgenommenen Beobachtungen bestätigen die Abwesenheit von Holz und die Anwesenheit von Zellulose und Substanzen, die mit Alkalien ausziehbar sind. So lösen sich die gelbbraunen Membranen der Brutkörper von Georgia pellucida langsam in konzentrierter Schwefelsäure und werden mit Osmium geschwärzt und mit Chlorzinkjod goldbraun. Nach Vorbehandlung mit Eau de Javelle schwärzt Osmium nicht mehr und Chlorzinkjod färbt violett[4]).

Die Primärmembran des **Sphagnaceen** besteht aus Zellulose mit eingelagerten Pektinstoffen. Der Primärmembran sind eine oder zwei Zellulosemembranen aufgelagert.

Bei Sphagnum papillosum ist den Zelluloselamellen der Blattzellen eine gerbstoffhaltige Membran von Cuticulacharakter aufgelagert. Sie wird mit Alkalilauge intensiv gelb bis gelbbraun gefärbt und hebt sich durch Behandlung mit mäßig konzentrierter Schwefelsäure in stark gewelltem Zustand von der Zelluloseschicht ab (Brünning)[5]).

---

[1]) G. Gjokić, Chem. Beschaffenh. d. Zellhäute b. d. Moosen, Österr. bot. Ztschr., 1895, XLV, S. 330.

[2]) Ruge, Organe der Lebermoose, Flora, 1893, S. 301.

[3]) F. Czapek, Zur Chemie der Zellmembranen bei den Laub- und Lebermoosen, Flora, 1899, LXXXVI, S. 361.

[4]) C. Correns, Über d. Brutkörper d. Georgia pellucida u. der Laubmoose, Ber. deutsch. bot. Ges., 1905, XIII, S. 420.

[5]) E. Brünning, Über die Zellmembranen der Sphagnaceen, Beihefte z. bot. Centralbl. 1927, XLIV, S. 241.

Die Zellmembranen des jungen Zentralkörpers von Sph. papillosum enthalten Gerbstoff (nur mit Eisensalzen nachgewiesen), der allmählich in Farbstoffe (Phlobaphene) übergeht. Sphagnol ist bei der Farbstoffbildung nicht beteiligt.

Sphagnol ist, abgesehen von der Primärmembran, hauptsächlich dort vorhanden, wo zwei Membranen aneinandergrenzen, außerdem in den Lamellen selbst.

Nach Senft wandeln sich bei Mnium Phenole durch Oxydation in Farbstoffe um.

Bei den **Gefäßkryptogamen** nähert sich der chemische Aufbau der Membran dem der höheren Pflanzen. Die Ligninreaktion mit Phloroglucinsalzsäure tritt bei Equisetum (mechanische Elemente) und Salvinia (Tracheiden) nicht, oder doch nur schwach (Salvinia) ein; starke Reaktionen geben Sklerenchym, Parenchym, zuweilen Mesophyll der Farne und die Mesophyllzellen einiger Lycopodiaceen[1]). Weiteres über die Verholzungsreaktionen der Gefäßkryptogamen s. S. 980. Pektine treten reichlich auf, und zwar nicht nur in der Mittellamelle und in den Auskleidungen (Mangin, Lit. S. 931, 2), sondern auch in Trichomen (Tunmann, Lit. S. 150, 4). Der Hauptbestandteil der Membran ist Zellulose. Die Zellulosereaktionen hat Tunmann an nicht stark braun gefärbten Wänden (Adiantum) mit Jodschwefelsäure direkt erhalten bei längerer Einwirkung einer völlig konzentrierten Säure. Vielfach wird man jedoch den braunen, „Gerbstoffreaktionen" gebenden Körper (Vagin, A. Meyer) vor der Jodreaktion durch kurze Behandlung mit Eau de Javelle entfernen müssen. Die nähere Natur des Vagins ist nicht bekannt. Weingeistige und wässerige Kalilauge verändern den Körper selbst beim Kochen nicht, auch treten keine Seifenmassen aus. Werden die Schnitte nacheinander mit weingeistiger 20proz. Kalilauge, Eau de Javelle und heißem Wasser behandelt, dann zeigt sich, daß „der durch Kalilauge nicht herausgelaugte Farbstoff sich nach der Einwirkung von Eau de Javelle in hellgelblichen Tropfen von teilweise kristallinischer Struktur auf der Membran und in den Zellen ausgeschieden hatte" (Bäsecke, Lit. S. 990, 4). Diesen oder doch einen nahestehenden Körper führen auch die braunen Wände verschiedener Farntrichome (Cibotiumarten u. a., Penghwar Djambi), welche bei der Mikrosublimation Kristalle geben, die unter Deckglas in Kalilauge unlöslich sind (Lit. S. 150, 4).

---

[1]) K. Linsbauer, Zur Verbreitung des Lignins bei Gefäßkryptogamen, Österr. bot. Ztschr., 1899, XLIX, S. 317; auch: Thomae (Jahrb. f. wiss. Bot., 1886, XVII, 99) u. a.

Mikrochemisches über Hefe

Die Membran der Hefezelle[1]) besteht aus einem Phosphorgluko-proteid, die ihr aufliegende Kittschicht enthält ein an Eiweiß gebundenes grampositives Lipoid, sowie ein N- und P-haltiges sphingomyelinähnliches. Außerdem kommen Plasteoproteide in ihr vor. Die Zellmembranen der Hefesporen dagegen bestehen aus Lipoideiweißverbindungen.

Zur Darstellung der äußeren Hefezellschichten wird Vitalfärbung mit Viktoriablaubase und eine Gramfärbung in vitro (Anilin-Gentianaviolett) benutzt.

Die Zellmembran der Hefe kann ferner nach folgenden Verfahren zur Anschauung gebracht werden[2]).

1. Die über Nacht mit Silbernitratlösung behandelten, durch teilweise Reduktion grau gewordenen Hefezellen werden in der Zentrifuge mit destilliertem Wasser silberfrei gewaschen und dann mit Pyrogallol-Leitungswasserlösung im hängenden Tropfen untersucht. Man erkennt neben dem braunschwarzen Zellinhalt die nur ganz schwach hellgelb gefärbte doppelt konturierte Zellmembran.

2. Käufliche Hefe wird im Verhältnis 1 : 10 mit 1 : 4 verdünnter Salzsäure eine Stunde lang im Schüttelapparat geschüttelt und nach Abzentrifugieren und einmaligem Auswaschen in der Zentrifuge mit destilliertem Wasser wieder im Verhältnis 1 : 10 mit 25proz. HCl-Weingeist (HCl 25 ccm, 96proz. Weingeist ad 100) 6 Stunden lang geschüttelt. Die jetzt gramnegativ gewordenen Hefen werden mehrmals mit kaltem 96proz. Weingeist gewaschen, mit der Hälfte destilliertem Wasser angerührt, auf Objektträger ausgestrichen und in der Hitze fixiert.

Man färbt die Ausstriche 2 Minuten lang mit 1proz. Erythrosinlösung, spült ab, behandelt 2 Minuten mit 5proz. Tannin, spült ab und färbt mit Methylenblau nach. Membran blau, Zelleib erythrosinrot.

Zur Sporenfärbung behandelt man die Ausstriche einige Minuten mit der Unnaschen Bepi-Lösung (rotes Phloxin, Pikrinsäure, Wasserblau), die roten Sporen sind von dem blauen Membranring umgeben. Liebermann und v. Bittó[3]) glauben aus Hefe Zellulose dargestellt zu haben.

---

[1]) J. Schumacher, Das Ektoplasma der Hefezelle. Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung der Zellenmembran und der Kittsubstanz der Hefezelle, Zentralbl. Bakt. usw., Abt. I, Orig., 1928, CVIII, S. 193; Ref. Ztschr. wiss. Mikrosk. 1928, XLV, S. 531.

[2]) J. Schumacher, Diskussionsbemerkung, Centralbl. Bakter. Originale, 1924, XCIII, S. 238. — Derselbe, Das Ektoplasma der Hefezelle, Centralbl. Bakter., Abt. I, Originale, 1928, CVIII, S. 193.

[3]) L. Liebermann und B. v. Bittó, Zentralbl. f. Physiol. 1894, VII, S. 857.

Der Nachweis der Kerne kann folgendermaßen vorgenommen werden:

Hefezellen (in Würze kräftig gezüchtet) werden gewaschen, dann nach H. Zikes (Fix. u. Färben d. Hefen, Centralbl. Bakt., 1911, 2, XXXI, 507) mit konzentrierter Sublimatlösung oder Chromessigsäure fixiert (24 Stunden), wiederum gewaschen (24 Stunden) und je 4 Stunden lang in 25-, 50-, 75- und 96proz. Alkohol gehärtet. Dann folgt Eisenalaun (2,5 g : 100 ccm Wasser, 4 Stunden), Hämatoxylin (0,5 g : 100 ccm Wasser, 18—24 Stunden) und schließlich Differenzierung in 1% Schwefelsäure. Trennung der Hefe von den Flüssigkeiten durch Zentrifugieren.

Nach Henneberg[1]) kann man in jeder lebenden Hefezelle den Kern sofort sichtbar machen, wenn man das Kernplasma durch 0,5 bis 0,75proz. Essigsäure, Weingeist o. dgl. reizt. Das Gelingen der Kernfärbung ist in hohem Maße von dem physiologischen Zustand der Hefe abhängig. Sehr glykogenreiche Zellen eignen sich gut zur Kernfärbung. Vor der Kernfärbung fixiert man am besten mit 10proz. Formaldehyd. Man bringt die Hefe dann auf Deckgläser, fixiert sie in der üblichen Weise, bringt sie dann nach Heidenhains Methode etwa eine Stunde in eine 2½proz. Lösung von Eisenalaun und dann mindestens drei Stunden in Hämatoxylinlösung. Die nachfolgende Differenzierung in Eisenalaun muß sich nach dem Zustand der Hefe richten und so ausgeführt werden, daß die schwarze Färbung möglichst nur im Kern haften bleibt.

Henneberg gibt weiter an, daß die von Guilliermond und Janssens zuerst bei der Kernfärbung beobachteten „Chondriosomen" oder strangförmigen „Chondriokonten" sich nur im Glykogenzustand der Hefe vorfinden und daß sie aus den bläschenförmigen „Mitochondrien" hervorgehen und sich in diese zurückverwandeln. Sie sind nicht identisch mit den metachromatischen Körpern = Volutin.

Durch sehr verdünnte Lösungen von Löfflers Methylenblau (Einwirkungsdauer 20 Minuten) oder Gentianaviolett lassen sich die Kerne vital färben, während die Zellen noch gänzlich ungefärbt sind.

Vgl. dazu S. 1015.

Färbung des Zellkerns bei Hefen u. dgl. nach Zettnow[2])

1. Auf einem Eisenblech werden einige Deckgläser 2—3 Minuten lang mit großem Brenner stark erhitzt, um sie von Fett zu befreien.

---

[1]) W. Henneberg, Über den Kern und über die bei der Kernfärbung sich mitfärbenden Inhaltskörper der Hefezellen, Zentralbl. für Bakteriologie usw., 2. Abt., 1916, XLIV, S. 1.

[2]) Zettnow, Kerne und Reservestoffe bei Hefen und verwandten Arten, Ztschr. f. Hyg. u. Infektkrankh., 1920, XC, S. 183.

2. Es wird eine ziemlich starke Aufschwemmung des betr. Organismus in einem Tropfen Wasser hergestellt.
3. Man bringt auf das Deckglas eine mittelgroße Öse von Eiweißlösung[1]), fügt das gleiche Volumen der Aufschwemmung hinzu, mischt und breitet aus. Wenn nach 10—20 Sekunden die Flüssigkeit ein wenig eingetrocknet ist, ohne daß jedoch die Ränder bereits trocken erscheinen, werden 3—4 Tropfen Fixierungsflüssigkeit, meist 35proz. Formalin, von einer Seite mit Hilfe einer ausgezogenen Glasröhre zugesetzt, 5—8 Minuten darauf gelassen, dann gespült.
4. Man beizt mit 5—6 Tropfen 2,5—3proz. Eisenalaun 2—3 Stunden auf dem Deckglase; nach gutem Spülen bringt man es für mindestens drei Stunden in die Hämatoxylinlösung.
5. Die Differenzierung durch Eisenalaun wird, da verschiedene Arten ungleiche Zeit zur Aufhellung gebrauchen, zuerst mit Hilfe eines mittelstarken Trockensystems, 8,0 mm Apochromat, dann mit Ölimmersion beobachtet.
6. Das genügend aufgehellte Präparat wird mit Leitungswasser gewaschen, dann in Wasser liegend mit Vaselin umrandet und photographiert oder in Glyzeringelatine (1 Gelatine, 6 Wasser, 7 Glyzerin, 1 Tropfen $N/_1$-Natronlauge) eingelegt. Zur Unterscheidung von Volutin benützt man dessen Eigenschaft in einem Gemisch von zwei Volumen 1proz. Schwefelsäure und ein Volumen polychromem Methylenblau eine rosarote Färbung anzunehmen, wenn man ein mit Formalin fixiertes Präparat auf einen Tropfen obiger Flüssigkeit legt.

   Den arbeitenden amöboiden Kern lebender Bierhefen kann man nach Henneberg mit verdünnter Essigsäure (0,2proz.) sichtbar machen.

Zum Nachweis des Nucleolus in der Nektarhefe Amphiernia rubra benützte Grüß[2]) folgendes Reagens:

I. 0,2 g Vanadinsäure Kahlbaum werden mit 2 ccm Salzsäure bis zur Lösung erwärmt. Nach Zusatz von 0,1 g pulverisierter Weinsäure erhitzt man, bis sich diese unter Aufschäumen zersetzt hat. Die noch überschüssige Salzsäure wird durch gelindes Abrauchen möglichst entfernt. Die schön blau gefärbte, mit Wasser wieder zu 2 ccm aufgefüllte

---

[1]) Man schüttet 0,1 g Albumen ovi siccum auf die Oberfläche von 10 ccm destilliertem Wasser, filtriert, wenn nach 15—20 Minuten Lösung erfolgt ist, und setzt ein halberbsengroßes Körnchen Thymol hinzu.

[2]) J. Grüß, Genetische und gärungsphysiologische Untersuchungen an Nektarhefen, Jahrbücher f. wissensch. Botan. 1927, LXVI, S. 109.

Flüssigkeit wird durch ein kleines Filter von dem ungelöst gebliebenen Rückstand befreit und verschlossen aufbewahrt.

II. Zu der Lösung von 0,5 g Lithiumhydroxyd in 20 ccm Wasser gibt man unter Erwärmen soviel Molybdänsäure, daß in der Flüssigkeit ein kleiner Rest übrig bleibt. Die Flüssigkeit muß auf Lackmuspapier deutlich sauer reagieren.

Zu 0,2 ccm der in einem verschließbaren Glasröhrchen befindlichen Lösung I gibt man 1,5 ccm und tropfenweise mehr und mehr der Lithiumsalzlösung bis die Flüssigkeit dunkelbraunviolett bis bordeauxfarbig geworden ist.

Die Zellen werden durch Alkoholäther entfettet, zur Entfernung von Schleim erst mit schwachem Alkali und zu dessen Beseitigung mit Molydänsäure behandelt. Bringt man sie dann in die braunviolette Farblösung, so nehmen die Nukleinkörnchen in dem bläulich erscheinenden Plasma eine rötlich-amethystfarbene Färbung an, die besonders bei längerem Verweilen in der Farblösung deutlich hervortritt.

Die Färbbarkeit der toten, aber auch geschwächter lebender, Hefezellen mit Methylenblau nimmt mit steigendem p_h (2—9) und der damit in Zusammenhang stehenden Konzentration der freien Farbbase zu. Aufbewahren der lebenden Hefe in elektrolytfreiem Wasser und noch mehr in elektrolytfreier Zuckerlösung bewirkt infolge Veränderung der Permeabilität, daß die Färbbarkeit der Zellen erhöht wird[1]).

Zur Mikrochemie der Bakterien

Zellmembran der Bakterien

Nachweis des „Ektoplasmas" nach Gutstein[2]) bei grampositiven Bakterien.

Die Ausstriche werden am besten in einer gesättigten Lösung von Magnesiumsulfat oder Ammonsulfat fixiert, dann 2 Minuten mit 5proz. Tanninlösung behandelt und dann gründlich mit Wasser abgespült. Dann 5 Sekunden bis 1 Minute in die 1proz. wässerige Lösung eines basischen Farbstoffs.

---

[1]) H. Fink und F. Weinfurtner, Die Methylenblaufärbung von Hefezellen und ihre Beziehung zur Wasserstoffzahl und zum Permeabilitätsproblem I und II, Wochenschr. Brauerei 1930, XLVII, S. 89; Chem. Centralbl. 1930, I, S. 3200.

[2]) M. Gutstein, Über eine allgemeine Methode zur Darstellung des Ektoplasmas der grampositiven Bakterien, Centralbl. Bakt., Abt. I, Originale, 1924, XCIII, S. 393.

Nachweis der Kapsel (Schleimschicht) nach van Riemsdijk[1]).

1. In ein kleines Reagensglas (Agglutinationsröhre) bringt man 5 Tropfen Protargollösung 1 : 200 (mittels Pipette). 2. In dieser Flüssigkeit zerreibt man ein wenig von der frischen zu untersuchenden Bakterienkultur. 3. Hierzu 5 Tropfen Eosinlösung (Eosingelb 1 : 50 Soda 20 %). 4. Gut mischen und 10—20 Minuten ruhig stehenlassen. 5. Mit einer Öse vorsichtig von der Flüssigkeit auf ein reines Objektglas gleichmäßig dünn ausstreichen. 6. An der Luft trocknen lassen. 7. Mit Zedernöl sofort mikroskopisch beobachten.

Hat die untersuchte Bakterienzelle eine Kapsel, so zeigt sich folgendes: Die Zelle ist schwach rötlich gefärbt, umgeben von einer weißen Zone, welche rings um den Bazillenleib verläuft; diese Zone ist durch einen scharfen roten Rand von dem homogenen rötlichgefärbten Untergrunde abkonturiert. Ist keine Kapsel vorhanden, so fehlt die weiße Zone; der rote Rand schmiegt sich sofort direkt dem Zellenrande an.

Zur Sichtbarmachung von Kapseln und Scheiden kann man die Bakterien in Tusche (mit Wasser verdünnte Perltusche) oder Kollargollösung (1 : 5) verreiben, sie auf dem Objektträger dünn und gleichmäßig ausstreichen und nach dem Austrocknen mit der Ölimmersion untersuchen. Das Bakterium mit der Kapsel erscheint als heller Hof; die Bakterien können noch mit Farbstoffen behandelt werden[2]).

Nachweis des Ektoplasmas bei gramnegativen Bakterien nach Gutstein[3]).

Die in der Hitze fixierten Objektträgerausstriche von Plattenkulturen werden 5—10 Minuten mit 30proz. Tannin bei gewöhnlicher Temperatur behandelt, gründlich mit Leitungswasser abgespült und darauf 5—10 Minuten mit einer 1proz. wässerigen Lösung von Fuchsin, Safranin, Methylenblau, Methylenblau 2 B extra oder Methylviolett gefärbt, abgespült und getrocknet.

Zellkerne für Bakterien hat A. Meyer (Zellkern d. Bakt., Flora, 1908 XCVIII, 335) zuerst angegeben und gefärbt (frühere Untersucher hatten Vakuolen, Volutin u. a. für Zellkerne gedeutet). Das mit Wasser abgekochte Material (Bac. Pasteurianus) kommt in schwefelsaures Eisenoxydammoniak (½ %, 24 Stunden), dann in Hämatoxylinlösung (1 : 200 24 Stunden) und wird mit verdünnter

---

[1]) van Riemsdijk, Die Kapseln der Bakterien und eine neue Methode, diese einfach darzustellen, Zentralbl. Bakt., Abt. I, Originale, 1921, LXXXVI, S. 177.

[2]) R. Lieske, Kurzes Lehrbuch der allgemeinen Bakterienkunde, 1926 (Berlin, Gebr. Borntraeger), S. 321.

[3]) M. Gutstein, Färberischer Nachweis und chemischer Bau des Ektoplasmas der gramnegativen Bakterien, Zentralbl. Bakt., Original, 1926, C, S. 1.

Salzsäure differenziert (5 Tropfen in 10 ccm Wasser). Man kann mit Flemming fixieren (1 + 1,3 Stunden), mit 20% Alkoholhärten, mit Delafield (1 + 1 Vol., 24 Stunden) färben und mit Salzsäure-Alkohol differenzieren oder: mit Flemming fixieren, mit 20% Alkohol härten, mit Eisenhämatoxylin färben und mit Ferriammoniumsulfat unter Deckglas differenzieren. Die Trennung des Materials von den verschiedenen Flüssigkeiten wird durch Zentrifugieren bewirkt.

Die Frage, ob die Bakterien überhaupt einen Zellkern besitzen, ist noch stark umstritten, obgleich Kruis schon 1913 die Kernteilungsfiguren der Bakterien photographiert haben will. Während eine Anzahl von Autoren das Vorhandensein eines Bakterienkerns durchaus bestreitet, geben andere mehrere Verfahren zu ihrem Nachweis an.

Das Nähere ist aus folgendem zu ersehen:

Nach Alexejeff[1]) besitzen die Bakterien weder Zellkern noch Chromatin. Er unterscheidet bei Bac. mitochondrialis: 1. Das Plasma. 2. Die Mukosome (Metachromatische Körner, Volutin A. Meyers). 3. Mitochondrien (die Chromatinkörner anderer Autoren). 4. Glykogen.

In Micrococcus ochraceus gibt es kein dem Begriff des Zellkernes entsprechendes Gebilde (Luska)[2]).

Der Bau der Bakterien entspricht nach Awerinzew[3]) dem anderer Protisten. Ihr Körper besteht aus Plasma und einem vom Plasma abgesonderten Kern, der aber in einigen Fällen fehlen kann.

Nachdem Král auf Photographien von Azotobacter chroococcum Körperchen abgebildet hatte, die große Ähnlichkeit mit echten Kernen zeigten, stellte Kruis[4]) in Anlehnung an Köhler fest, daß bei Bakterien (wie bei Infusorien) beim Photographieren mit ultraviolettem Licht die Kerne aus der übrigen optisch leeren Plasmamasse als schwarze Flecken hervorspringen.

Färbung von Bakterienkernen nach Schuhmacher[5])

1. Nukleinsäurefreier:

Die hitzefixierten Präparate kommen

a) über Nacht, also ca. 8—12 Stunden in 5proz. Schwefelsäure oder 2—4 Stunden in 1 : 4 verd. Salzsäure.

---

[1]) A. Alexejeff, Sur la question du noyau chez les Bactéries (Contribution á l'étude des *mitochondries et des grains métachromatiques*), Arch. f. Protistenkunde 1924, XLIX, S. 396.

[2]) Fr. Luska, Arch. f. Protistenkunde 1914, XXXIII, 272. Morphologisch-biologische Untersuchungen über die färbbaren Körnchen im Inhalte des Micrococcus ochraceus.

[3]) S. Awerinzew, Bakterienstudien, Arch. f. Protistenkunde, 1924, XLIX, Seite 84.

[4]) K. Kruis, Mikrophotographie der Strukturen lebender Organismen, insbesondere der Bakterienkerne mit ultraviolettem Lichte, Bull. intern. l'académie sciences Bohême, 1913, Ref. Bot. Zentralbl. 1915, CXXIX, S. 152.

[5]) J. Schumacher, Über den Nachweis des Bakterienkerns und seine chemische Zusammensetzung, Zentralbl. Bakt., Abt. I, Originale, 1926, XCVII, S. 81.

b) Nach gründlichem Abspülen mit destilliertem Wasser werden die Präparate 10 Sekunden lang in Sodalösung gebadet.

c) Nach abermaligem Abspülen färbt man mit 1proz. wässeriger Methylenblaulösung. Noch bessere Bilder erhält man, wenn man mit einer 1proz. wässerigen Lösung von Methylenazur nachfärbt, wobei aber bereits das Lipoproteid sich etwas anfärbt oder mit 1proz. Karbolmethylenblau.

2. Nukleinsäurehaltiger:

a) Man stellt hitzefixierte Ausstriche 5 Minuten lang in 2proz. Essigsäure, spült mit Wasser gründlich ab und bringt sie 1 Stunde lang in eine 1proz. Albarginlösung, der man auf 100 ccm 3 Tropfen Ammoniak zugesetzt und die man vor Gebrauch filtriert hatte. Darauf wird gründlich mit destilliertem Wasser abgespült und die Präparate 30 Sekunden lang mit einer 3proz. Pyrogallol-Leitungswasser-Lösung nachbehandelt. Abspülen mit Wasser, in der Flamme trocknen. Schwarzbraune Färbung.

b) Die hitzefixierten Ausstriche kommen über Nacht in 1 : 50 verdünnte Salpetersäure. Nach gutem Abspülen mit Wasser färbt man 2 Minuten lang mit 1proz. Methylenblau- oder Pyroninlösung.

Zum Aufsuchen der Kerne vermeidet Alexejeff (l. c.) sorgfältig das Austrocknen und verwendet zum Fixieren Lenhosseks Flüssigkeit. Gutstein[1]) färbt das „Makrogranulum“ (=Zellkern) der Bakterien und Hefen mit der Karbolmethylenblau-Tannin-Safranin-Methode, nachdem die Nukleoproteide durch 24stündige Behandlung mit 10- bis 25proz. Salzsäure entfernt wurden. Das Makrogranulum enthält nach seinem färberischen Verhalten ein Lipoid.

Die Mikrogranula, die wahrscheinlich aus einem sauren, eisenhaltigen gramfesten Lipoid bestehen, färben sich nach Vorbehandlung mit Salzsäure (s. o.) mit Karbolmethylenblau-Tannin-Phosphin metachromatisch rot, ebenso mit Polychrommethylenblau. Nach Eisenberg gefärbt und mit Tannin-Safranin nachbehandelt, erscheinen sie schwarz.

Protoplasma und dessen Bestandteile

Die Mitochondrien von Bac. mitochondrialis färben sich weder mit *Hämatoxylin* (Delafield) noch mit Karmin, noch mit Ranviers Pikrokarmin, noch mit essigsaurem Methylgrün.

[1]) M. Gutstein, Über den Kern und den allgemeinen Bau der Bakterien, Zentralbl. Bakt., Abt. 1, Original, 1925, XCV, S. 357.

Die metachromatische Substanz ist in vielen Fällen in den Zellen gelöst (Promukoid).

Die an Mitochondrien reichen Bakterien färben sich nach Gram, die davon freien nicht (Alexejeff).

Das Protoplasma des Micrococcus ochraceus enthält 1. die scheidewandbildenden Körner, 2. die mit dem Stoffwechsel kausal zusammenhängenden Ochraceinkörner. Beiderlei Körner färben sich in gleicher Weise wie das Chromatin der Zellkerne.

Die Körnchen zweiter Ordnung färben sich (stark variierend) mit Methylenblau + Jodjodkalium + Natriumkarbonat stark dunkelbraun; die Entfärbung geht sehr langsam vor sich.

Karbolfuchsin färbt dunkelrot, Formolfuchsin intensiv rot; sie färben sich ferner mit 1proz. wässeriger Eosinlösung und Hämatoxylin. Bei der Gramfärbung färben sie sich mit Gentianaviolett, mit Alkohol werden sie entfärbt. Gegen Fettreagentien verhalten sie sich negativ. Über ihr weiteres Verhalten orientiert die umstehende Tabelle, die auch die entsprechenden Eigenschaften von Volutin, Nuclein und der Bakterienkerne nach Meyer angibt (Luska)[1].

Färbung von Bakterien-Cilien[2])

Verfahren von Casares-Gil.

Lösung. a) Stammlösung. In einem Mörser löst man 10 g Tannin und 18 g wasserhaltiges Aluminiumchlorid in 30 ccm 70proz. Weingeist. Dazu fügt man tropfenweise eine Lösung von 10 g Zinkchlorid in 10 g Wasser und weiter 1½ g Rosanilinchlorhydrat.

b) Davon stellt man unmittelbar vor Gebrauch die nötige Verdünnung her, indem man in einem Reagensglas die Stammlösung mit der vierfachen Menge Wasser verdünnt, umschüttelt und nach 1 Minute filtriert. Man läßt die Tropfen vom Filter auf das Präparat fließen, wartet etwa 1 Minute, bis sich eine dünne metallglänzende Schicht gebildet hat und wäscht schnell mit Wasser.

Man kann daran in 1 bis 2 Minuten noch die gewöhnlichen Bakterienfärbungen mit Karbol-Fuchsin oder Methylenblau anschließen.

Sehr genaue Angaben über die Färbung der Geißeln der Schwefel-

---

[1]) Fr. Luska, Morphologisch-biologische Untersuchungen über die färbbaren Körnchen im Inhalte des Micrococcus ochraceus. Ein experimenteller Beitrag zur Kernfrage bei den Bakterien, Arch. f. Protistenkunde, 1914, XXXIII, S. 272.

[2]) B. Galli-Valerio, La méthode de Casares-Gil pour la coloration des cils des bactéries, Zentralbl. Bakt., Abt. I, Originale, 1915, LXXVI, S. 233.

Verhalten von Volutin, Nuclein, Bakterienkernen und der Körnchen von Micrococcus ochraceus gegen verschiedene Reagentien

	Die Körnchen im Micrococcus ochraceus	Volutin nach Meyer	Nuclein	Bakterienkerne nach Meyer
Kaltes Wasser	nach 24 Stunden nicht gelöst; die Körner verschwinden nach 4—6 Tagen	löst nach 24 Stunden	löst oder nicht je nach der Art	löst nicht auf
80° heißes Wasser	nach 5 Minuten werden einige gelöst, der größte Teil nicht	löst nach 5 Minuten	löst oder nicht je nach der Art	löst bisweilen
kochendes Wasser	nur wenige werden gelöst	löst früher als in 5 Minuten	löst oder nicht je nach der Art	löst bisweilen
Alkohol, Chloroform, Äther	löst nicht auf	löst nicht auf	löst nicht auf	löst nicht auf
Kalilauge 1 proz.	löst nicht auf	?	löst auf	löst bisweilen
Kalilauge 10proz.	löst teilweise	löst auf	löst auf	löst auf
Barytwasser	löst nicht auf	?	löst nicht auf	?
Schwefelsäure 1 proz.	löst nach 24 Stunden nicht auf	löst nach 24 Stunden	löst nicht auf	löst nicht auf
Schwefelsäure 5 proz.	löst nach 24 Stunden nicht auf	löst nach 5—10 Minuten	löst nicht auf	löst nicht auf
Salzsäure 1 proz.	löst nach 24 Stunden nicht auf	löst nach 24 Stunden	löst nicht auf	löst nicht auf
Salzsäure 5 proz.	löst nach 24 Stunden nur zum kleinen Teil	löst nach 24 Stunden	löst nicht auf	löst nicht auf
Pepsin	löst nicht auf	wie Wasser	löst nicht auf	löst nicht auf
Trypsin	löst nicht auf	wie Wasser	löst meistens auf	löst auf
Pepsin + Trypsin	löst nicht auf	?	löst auf	löst auf
Speichel	löst nicht auf	?	—	—

Durch Eosin werden im Gegensatz zu A. Meyer die in den Bakterien enthaltenen Körner gefärbt (Sumbal).

bakterien macht Kolkwitz[1]). 1. Die Flüssigkeit mit dem lebenden Material wird auf gut entfettete Objektträger ausgestrichen und zunächst nach 2. fixiert.

2. Der Inhalt eines käuflichen Röhrchens mit 0,1 g Osmiumsäure wird in ein kleines trockenes Präparatenglas geschüttet, dessen Boden mit Glaswolle[2]) bedeckt ist. Der vorbereitete Objektträger wird hineingestellt und der Deckel des mit schwarzem Papier umkleideten Glases sogleich wieder aufgesetzt. Man setzt die Organismen, die feucht bleiben müssen, den Dämpfen der Osmiumsäure höchstens eine halbe Minute lang aus. 3. Man läßt das Präparat — am besten 24 Stunden lang — in Zimmerluft trocknen. 4. dann taucht man es 5 Minuten in ein Gemisch von 1 ccm Eisessig, 20 ccm Formalin (ca. 40proz.), 100 ccm destilliertes Wasser. 5. Man spült mit destilliertem Wasser ab und färbt nach Loeffler.

Verfahren von Zikes[3]).

Nötig ist außer frisch bereitetem, filtriertem Gentianaviolett-Anilinwasser (Ehrlichsche Lösung) folgende Beize: Zu einer auf dem Wasserbad bereiteten Lösung von 2 g Tannin in 8 ccm Wasser gibt man nach dem Abkühlen tropfenweise 5 ccm einer kalt bereiteten, vollständig gesättigten Chromalaunlösung, dann 1,5 ccm 1 proz. Osmiumsäure und zuletzt 1 ccm gesättigte Gentianaviolett-Urlösung. Die Beize kann nach kurzem Umschütteln und Filtrieren sofort verwendet werden. Man beläßt die Beize entsprechend lange auf dem Präparat, wäscht gut unter der Wasserleitung ab und trocknet unter Abblasen des Wassers über einer kleinen Flamme, indem man das Deckglas an den Kanten mit den Fingern hält, um beurteilen zu können, ob es nicht zu hoch erhitzt wurde. Man bringt dann 1—2 Minuten in die Farbstofflösung, wäscht ab und mikroskopiert.

Nach einem von Rottgardt angegebenen Verfahren kann man die Cilien von Bakterien versilbern[4]). Man benutzt dazu als Beize eine Mischung von A = 10 g Tannin bei 40° mit 150 ccm destilliertem Wasser gelöst und B = erkaltete

---

[1]) R. Kolkwitz, Über die Geißeln der Schwefelbakterie Chromatium Okenii (Ehrb.) Perty, Ber. deutsch. bot. Ges. 1927, XXXXV, S. 30.

[2]) Wird die Glaswolle im Lauf der Zeit allmählich naß, so bereitet man eine Schicht neuer darüber aus. Die Osmiumsäure muß erneuert werden, wenn der Inhalt nicht mehr deutlich riecht, meist nach etwa acht Wochen.

[3]) Zikes, Die Geißelfärbung, Zentralbl. f. Bakt. etc., II. Abt., 1930, LXXXI, S. 161; ebenda kritische Besprechung anderer Färbungen.

[4]) F. Neumann, Die Sichtbarmachung von Bakteriengeißeln am lebenden Objekt im Dunkelfeld, Zentralbl. Bakt., Abt. I, 1928, CIX, S. 143. — A. Rottgardt, Versilberungsmethoden für Cilien, Zentralbl. Bakt., Abt. 1, Origin. 1927, CIII, S. 430.

Lösung von 2 g Brechweinstein in 40 ccm destilliertem Wasser. Man gibt soviel B (24—26 ccm) zum erkalteten A, bis bei längerem Schütteln leichte Opaleszenz und schwach violette Färbung bestehen bleibt. Haltbarkeit 20—30 Tage.

Die Beize wird auf dem Objektträgerpräparat bis zum Schwinden der Trübung leicht erwärmt, bis zum Auftreten einer Trübung erkalten gelassen und gründlich mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Das bei leichter Wärme getrocknete Präparat wird mit ammoniakalischer Silberlösung (tropfenweiser Zusatz von Ammoniak zur Lösung von 1 g Silbernitrat in 50 ccm Wasser, bis nach Auflösung des braunen Niederschlags eine schwache Opaleszenz bleibt) bis zur Schwärzung erwärmt. Auswaschen und Trocknen. Haltbarmachung durch Ziehlsches Karbolfuchsin in der Hitze.

Nachträge

Zu S. 3

Heller (Mikrochemie 1930, VIII, S. 141) schlägt vor, an Stelle des Wortes „Grenzkonzentration“ das Wort „Verdünnungsgrenze“ zu setzen.

Zu S. 5 und 742

Als „vitales Artefakt“ bezeichnet Bělař[1]) „eine entstellende Veränderung der normalen Zellstruktur, die als Reaktion auf eine Behandlung mit Fixierungsmitteln oder auf präparatorische Eingriffe eintritt, aber noch vor der Koagulation des Protoplasmas“.

Zu S. 30

Nach Seemann[2]) werden alte mit Paraffin oder Vaselin umrandet gewesene Gläser (Objektträger und Deckgläser gesondert) ½ bis 1 Stunde gekocht; das oben aufschwimmende Fett wird alle 5 bis 10 Minuten abgegossen. Dann kocht man ½ Stunde in einer Seifenlösung, spült die Gläser zuerst mit heißem, dann mit kaltem Wasser gut ab und bringt sie 24—48 Stunden in Kalium-dichromat-Schwefelsäure. 6—12-stündiges Wässern unter der Leitung, Abspülen mit destilliertem Wasser, Trocknen mit sauberem weichen Baumwollappen, ohne die Oberfläche mit Fingern zu berühren.

Zu S. 35

A. Niethammer, Die Mikrogaskammer als Hilfsmittel bei mikroskopischen Untersuchungen, Zeitschr. wiss. Mikrosk. 1930, XVII, S. 72.

Zu S. 43

L. Kofler u. H. Hilbck, Über einen neuen Mikroschmelzpunktapparat, Mikrochemie 1931, IX; S. 38.

Zu S. 62

Der absolute Alkohol kann auch dadurch entbehrlich gemacht werden, daß man den Paraffinlösungsmitteln kristallisiertes Phenol zusetzt.

---

[1]) K. Bělař, Über die reversible Entmischung des lebenden Protoplasmas, Protoplasma 1930, IX, S. 209.

[2]) G. Seemann, Zur Technik der Supervitalfärbung, Ztschr. wiss. Mikrosk. 1930, XLVII, S. 323.

Bei Mischungen von 96proz. Weingeist mit Xylol muß man, damit es bei keinem Mischungsverhältnis zu einer Trübung kommt, letzterem etwa 2,5 % Phenol zusetzen, bei 90proz. Weingeist etwa 10 %, bei 85proz. etwa 25 % (Kisser)[1].

Zu S. 66

Mit dem Mikrotom-Modell K der Firma R. Jung-Heidelberg lassen sich Hölzer ohne Vorbereitung schneiden (Loew)[2].

Zu S. 69

Zum Aufkleben von Schnitten, die mit Eau de Javelle oder Pepsin-Salzsäure behandelt waren, verwendet Ullrich[3], da hier Eiweiß-Glyzerin versagt, eine mit 1 % Ammoniakflüssigkeit versetzte 1proz. Lösung des offizinellen Wasserglases. Man trocknet an der Luft und nachher kurz in der Wärme (unterhalb der Schmelztemperatur des Paraffins) oder sofort bei höherer Temperatur. Nach Weglösen des Paraffins wird der 70proz. und eventuell der nächstverdünnten Alkohollösung eine Spur Salzsäure zugesetzt. Die Präparate vertragen auch kurze Behandlung mit ganz schwach alkalischen Lösungen, also nicht eine Trypsinverdauung in Karbonatlösungen.

Die Kieselsäure färbt sich in keinem der bisher benutzten Färbemittel an.

Zu S. 75

A. Th. Czaja, Die Analyse der metachromatischen Färbungen von Pflanzengeweben mit organischen Farbstoffen, Ber. deutsch. bot. Ges. 1930, XLVIII, S. (100).

Zu S. 87

A. Mayrhofer, Über Immersionsflüssigkeiten zur Bestimmung des Brechungsvermögens fester Körper nach dem Einbettungsverfahren, Mikrochemie 1931, IX, S. 52.

Eine Mischung von Kanadabalsam und α-Bromnaphthalin als Einbettungsmittel ermöglicht durch große Viskosität die photomikrographische Untersuchung frisch eingebetteter Präparate (Jelley)[4].

---

[1] J. Kisser, Quant. Untersuchungen über die Herabsetzung der Wasserempfindlichkeit von Benzol und Xylol durch Zusätze von kristallisierter Karbolsäure, Ztschr. wiss. Mikrosk. 1930, XLVII, S. 342; vgl. auch E. Berta, Über die Ausschaltung des absol. Alkohols bei der Einbettung. Einbettung mittels Karbol-Alkohol, ebenda 1923, XL, S. 344.

[2] W. Loew, *Die Entstehung und Entwicklung des Mikrotoms*, Ztschr. wiss. Mikrosk. 1930, XLVII, S. 51.

[3] H. Ullrich, Aufkleben von Paraffinschnitten mit ammoniakhaltiger Wasserglaslösung, Planta 1930, X, S. 596.

[4] E. E. Jelley, Einbettungsmittel für mikroskopische Arbeiten, Nature 1930, CXXV, S. 672; Chem. Zentralbl. 1930, II, S. 587.

Zu S. 89

P. Metzner, Einfache Einrichtungen zur Fluoreszenzmikroskopie und Fluoreszenzmikrophotographie, Mikrochemie 1931, IX, S. 72.

Zu S. 91

K. John, Über die Zuverlässigkeit der Ergebnisse bei Dickenmessungen unter dem Mikroskop. Zeitschr. wiss. Mikrosk. 1929, XLVI, S. 395.

Zu S. 97

Um die Wirkungen auszuschließen, die eine saure Reaktion der Gelatine auf Färbungen, z. B. die mit Hämatoxylin ausübt, benutzt Groß eine Glyzeringelatine folgender Zusammensetzung. Man löst Gelatine in einer m/5-Boratlösung, fügt dieselbe Menge Glyzerin dazu und versetzt dann noch mit $N/_{100}$-Natronlauge, bis zum $p_h = 7,6$ (man bestimmt die Reaktion mit den Michaelisschen Indikatoren in einer Probe erwärmter flüssiger Gelatine (Groß)[1]).

Zu S. 110

Als Reagens auf Sauerstoff läßt sich nach Molisch[2]) auch die Flagellate Astasia benützen.

Zu S. 112

Über die Abfangung von Wasserstoffperoxyd mit Cerhydroxyd s. H. Wieland u. Mitarbeiter, Liebigs Annal. Chem. 1929, 477, S. 32 und 1930, 483, S. 217.

Zu S. 114

Kolkwitz[3]) hält die von Molisch, Lauterborn[4]) und A. Fischer studierten Vakuolen für Gasvakuolen und stellt Gasvakuolen bei Sarcina ventriculi fest.

Zu S. 126

Die Blasenzellen von Antithamnion enthalten entgegen Sauvageau weder freies Brom noch einen labilen bei saurer Reaktion Brom abspaltenden Stoff.

---

[1]) W. Groß, Zur Technik der Fettfärbung, Ztschr. wiss. Mikrosk. 1930, XLVII, S. 64.

[2]) H. Molisch, Pflanzenbiologie in Japan, Jena 1926, S. 129.

[3]) R. Kolkwitz, Über Gasvakuolen bei Bakterien, Ber. deutsch. bot. Ges. 1928, XLVI, S. 29 (mit zahlreichen Literaturangaben).

[4]) R. Lauterborn, Die sapropelische Lebewelt, Verh. d. naturw.-med. Ver. Heidelberg, 1915, N. F. XIII, H. 2.

Zu S. 129

Die Blasenzellen von Bonnemaisonia enthalten das Jod nicht in freiem Zustand, sondern hauptsächlich in Form von Alkalijodiden (Kylin)[1].

Zu S. 134

Nach P. Reckendorfer lassen sich sehr geringe Mengen von Fluor in der Pflanze mit Hilfe der Molybdat-Benzidin-Reaktion nachweisen (Fortschr. d. Landwirtsch. 1930, V, S. 481 nach Chem. Zentralbl. 1930, II, S. 1582).

Zu S. 135

Riehm[2]) empfiehlt zum Nachweis der Salpetersäure eine Lösung, die auf 100 ccm 38 ccm Wasser und 5 mg Diphenylamin enthält; außerdem ist Chlorid nötig.

Zu S. 138

Nitrite sind für Mais eine sehr gute Stickstoffquelle (Mevius und Dikussar)[3]).

Zu S. 152

Bor ist für Tomaten unentbehrlich (Johnston und Dore)[4]). A. R. C. Haar, Toxic effect of boron on fruit trees, Bot. Gaz. 1929, LXXXVIII, S. 113.

Zu S. 152 (Arsen) v. Fellenberg).
Biochem. Ztschr. 1930, CCXVIII, S. 300.

Zu S. 165

Um Kieselskelette von Epidermen zu erhalten, behandelt Kisser[5]) abziehbare Epidermen zuerst mit 30 proz. Wasserstoffperoxyd oder nach Mohl (1861) mit Schultzes Gemisch bis zur Entfärbung, Kochen mit Wasser und Waschen mit Weingeist. Nicht abziehbare Epidermen werden durch Mazerationsmittel (30 proz. Wasserstoffperoxyd, Schultzesches Gemisch u. a.) isoliert und können nach gründlichem Auswaschen verascht werden.

---

[1]) H. Kylin, Über die Blasenzellen bei Bonnemaisonia, Trailliella und Antithamnion, Ztschr. f. Bot. 1930, XXIII, S. 217.

[2]) H. Riehm, Systematische Untersuchung der Reaktion von Diphenylamin-Schwefelsäure usw., Ztschr. analyt. Chem. 1930, LXXXI, S. 353.

[3]) W. Mevius und J. Dikussar, Nitrite als Stickstoffquellen für höhere Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot. 1930, LXXIII, S. 633.

[4]) E. S. Johnston and W. H. Dore, The influence of boron on the chemical composition and growth of the tomato plant, Plant Physiology 1929, IV, S. 31.

[5]) J. Kisser, Methodik der Darstellung von Kieselskeletten aus Epidermen und Kutikulen, Ztschr. wiss. Mikrosk. 1930, XLVII, S. 338; Derselbe, Methodik der Herstellung pflanzlicher Aschenbilder und Kieselskelette in E. Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden.

Die Veraschung nimmt man auf einem Deckglas vor, das man auf einem Platinblech zu schwachem Glühen erhitzt.

Um die Kutikula behufs Veraschung zu isolieren, legt man kleine Blattstückchen in frisches starkes Eau de Javelle. Ist nach mehreren Tagen bis zu einer Woche die Mazeration sehr weit vorgeschritten, dann behandelt man die Gewebefragmente zuerst mit 5proz. Salzsäure und dann mit etwa 5proz. Ammoniak. Oder man beläßt kleine Blattstücke 12 Stunden bei 60° (in einem Thermostaten) in etwa 30proz. Schwefelsäure; nach gründlichem Waschen mazeriert man sie ebenso in 3proz. Wasserstoffperoxyd. Die dann allein noch übrige Kutikula schwimmt auf der Oberfläche der Flüssigkeit.

Beim Veraschen darf erst stärker erhitzt werden, wenn nach vorangegangener Bräunung das Präparat farblos wurde.

Der Kieselsäuregehalt der Kutikula ist mit Ausnahme derjenigen von Equisetum-Arten gering; in der Asche ist deshalb nur wenig einer Struktur zu sehen.

Zu S. 168

Fr. Tobler, Der Einfluß des Kaliums auf die Bildung der Faserzellwand der Faserpflanzen, Ztschr. f. Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde, Teil A, 1929, XIII, S. 1.

Zu S. 175

de Sornay[1]) hält das Natrium für das Wachstum ebenso nötig als das Kalium; es wirke indirekt dadurch, daß es das Kali des Bodens löslich mache.

Zu S. 192

Über Reaktionen des Magnesiums s. J. M. Kolthoff, Emich-Festschrift 1930, S. 180.

Zu S. 205

F. Brambring, Untersuchungen über die Wirkungen des Aluminiums auf Wasserpflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot. 1930, LXIII, S. 241.

Zu S. 207

In Bestätigung der Versuche von Bortels (Bioch. Ztschr. 1927, CLXXXII, S. 301) stellten Wolff und Emmerie[2]) fest, daß Aspergillus niger sowohl für sein Wachstum als für die Sporenbildung Spuren von Kupfer nötig hat.

Zu S. 213

Das Maximum an Azetaldehyd fällt nach A. Niethammer[3]) gewöhnlich mit dem Minimum an Oxalatdrusen zusammen.

---

[1]) P. de Sornay, Das Natrium bei den Pflanzen, Bull. Assoc. Chim. Suer. Dist. 1930, XLVII, S. 370 nach Chem. Zentralbl. 1930, II, S. 3163.

[2]) L. K. Wolff und A. Emmerie, Über das Wachstum des Aspergillus niger und den Kupfergehalt des Nährbodens, Biochem. Ztschr. 1930, CCXXVIII S. 443.

[3]) A. Niethammer, Mikroskopie und Mikrochemie bekannter heimischer Früchte, Planta 1930, XII, S. 399.

Zu S. 219

A. Frey-Wyssling faßt das Kalziumoxalat der die Gefäße begleitenden Ausscheidungszellen als ein Zwitter auf, das halb Defäkationsprodukt ist (in Beziehung auf das Kalzium), halb Exkretionsprodukt (in Beziehung auf die Oxalsäure).

Zu S. 220

Über das Verschwinden von Kalziumoxalat aus unreifen Früchten und Samen s. A. Niethammer, Bioch. Ztschr. 1930, CCXXVII, S. 462; auch Planta 1930, XII, S. 399 und Ztschr. Untersuchg. Lebensm. 1930, LIX, S. 501.

Zu S. 220

Untersuchungen von Kohlschütter und Marti[1]) über die Bildungsformen des Kalziumoxalates außerhalb der Pflanze liefern neue Gesichtspunkte für die Art und Weise, wie die einzelnen Formen des Kalziumoxalates innerhalb der Pflanze entstehen können. Von großer Bedeutung ist dafür eine neu beobachtete instabile — wahrscheinlich trikline — Vorform. Von entscheidendem Einfluß sind „die örtliche Bindung der Reaktion (topochemische Momente), die allmähliche Zuführung von Reaktionskomponenten (diachrone Reaktionsweise), die Beschränkung der Reaktion auf kleine Räume (Kleinraumprinzip)". —

Außerdem spielt das p_h des Mediums eine Rolle. „In ausgesprochen saurer Lösung ($p_h = 2{,}5 - 5$) bildet sich neben $F_{monokl.}$ reichlich $F_{trikl.}$ in u. U. sehr großen Kristallen; in ganz schwach saurer Lösung ($p_h = 6$) treten neben kleineren triklinen tetragonale Kristalle in den Vordergrund: in alkalischem Medium ($p_h = 8$) überwiegen die letzteren, ohne gänzlich die triklinen (und auch die monoklinen) zu verdrängen." „Von größter Wichtigkeit für die Ausgestaltung der Kalziumoxalatformen sind die Umwandlungsvorgänge der instabilen Phasen, speziell der triklinen. Die Phasenverwandlungen können über die Lösung gehen oder sich topochemisch unmittelbar im Raume der instabilen Kristalle vollziehen. Auf welcher Stufe (tetragonal oder monoklin) sie primär Halt machen, hängt vom p_h des Mediums ab."

Zu S. 275

Klein und Tauböck machen weitere Angaben über den Nachweis des Harnstoffs mit Xanthydrol und seine Verbreitung in den Pflanzen.

Da die Ureide durch Eisessig z. T. unter Entstehung von Harnstoff zerfallen, so wird durch das Verfahren von Klein und Tauböck[2]) Harnstoff in freier oder gebundener (Ureid-) Form angezeigt.

Zu S. 277

Dixanthylthioharnstoff sublimiert zwischen 175 und 210° und gibt bei ca. 210° unter Zersetzung und Auftreten von SO_2 eine gelbe Schmelze (Klein und Tauböck).

---

[1]) V. Kohlschütter und J. Marti, Über Bildungsformen des Kalziumoxalats, Helv. chim. Act. 1930, XIII, S. 930.

[2]) G. Klein und K. Tauböck, Harnstoff und Ureide bei den höheren Pflanzen, Jahrb. f. wiss. Bot. 1930, LXXIII, S. 193.

Zu S. 278 und 702

Über die Gegenwart von Allantoin, Allantoinsäure, Allantoinase und Urikase in zahlreichen pflanzlichen Nahrungsmitteln s. R. Fosse, A. Brunel, P. de Graeve, P. E. Thomas und J. Sarazin, Compt. rend. Acad. sciences, 1930, CXCI, S. 1153.

Zu S. 312

K. Jeffers, Chemische Untersuchungen über die Glykogenfärbung nach Best, Bioch. Zeitschr. 1930, CCXXIII, S. 184.

Zu S. 329

R. Fischer und F. Stauder[1]) empfehlen zum Nachweis des Juglons frische Blätter und Perikarpien mit Chloroform zu extrahieren und dieses dann im Fischerschen Sublimationsröhrchen (s. S. 37) weiter zu behandeln. Der Nachweis von α-Hydrojuglon gelang auch aus frischen Perikarpien nicht. Die von Tunmann durch Sublimation erhaltenen als α-Hydrojuglon gedeuteten zeisiggelben Nadeln halten sie für Juglon.

Zu S. 357

K. Fr. W. Hansen, Über Bitterstoffe aus der Alantwurzel, Ber. deutsch. chem. Ges. 1931, LXIV, S. 67.

Zu S. 375

Über das Vorkommen von Gerbstoffen in Blüten s. St. Jonesco, Compt. rend. Acad. sciences 1930, CXCI, S. 867.

Zu S. 391

Das Maximum an Inklusen fällt stets mit einem Minimum an Oxalatdrusen zusammen (A. Niethammer).

Dieselbe fand Inklusen bei Rosaceen und Saxifragaceen (l. c. S. 1028).

Zu S. 426

Über den Einfluß der Düngung bei Alkaloidpflanzen s. G. K. Kreyer, Heil- und Gewürzpflanzen 1930, XIII, S. 1.

Zu S. 483

G. Klein und Sr. M. C. Schlögl, Der Nachweis von Galegin, Österr. bot. Zeitschr. 1930, LXXIX, S. 340.

Zu S. 511

Der Holzkörper der Wurzel von Conium maculatum ist alkaloidfrei. Alkaloid ist in der Rinde in der Zone der gestreckten Rindenzellen und im Parenchym um die Sekretbehälter. Im Stengel ist es zwischen Collenchym und Siebteil, in der hypodermalen Schicht, den Zellgruppen zwischen den Collenchymstreifen und in den Schließzellen der Spaltöffnungen. Der Holzkörper ist alkaloidfrei. In Blattstiel, Spindel und

---

[1]) R. Fischer und F. Stauder, Zum Nachweis des Juglons, Pharmazeut. Zentralh. 1931, LXXII, S. 97.

Scheide wird das Alkaloid im Parenchym um die Leitbündel gespeichert, in den Blättern vorwiegend im Mesophyll. Die Blüte führt Alkaloid in allen Organen, die Frucht nur in der Fruchtwand. Das Alkaloid befindet sich im wesentlichen in der Nähe der Leitbündel und der Sekretbehälter (Nordheim)[1].

Zu S. 553

A. Niethammer, Lokalisation einzelner Glykoside, sowie des Phloroglucins unter Berücksichtigung benachbarter Kalkoxalatausscheidungen in der Pflanzenzelle, Beitr. z. Biol. d. Pflanzen 1930, XVIII, S. 335.

Zu S. 554

A. Niethammer[2]) konnte im Klein-Wernerschen Sublimationsapparat bei 10 cm Druck mehrere Glykoside sublimieren, so Aesculin (bei 258—270°), Digitonin (bei 280°), Rhinanthin (bei 320°), Syringin (bei 300°) sowie Saponarin und Salicin. Sie beschreibt ferner Reaktionen mit Brombromkalium bei Alectorolophus major, Melampyrum arvense, Orangen, Zitronen und Kastanienrinde.

Zu S. 561

St. Jonesco, Les anthocyanidines et les leucoanthocyanidines chez les végétaux, Annal. sciences nat., Bot. 1930 (X), XII, S. 250.

M. Fischer, Anthocyanführende Schließzellen bei Hyoscyamus, Biol. gen. 1930, VI, S. 293.

Zu S. 583

L. Zechner (Pharmaz. Monatshefte 1931, Nr. 1) glaubt dagegen in Arbutus unedo Arbutin nachgewiesen zu haben.

Zu S. 661

Über den mikrochemischen Nachweis des Mangins in Mangifera indica s. H. Molisch, Als Naturforscher in Indien (Jena 1930).

Zu S. 702

A. Brunel, Présence de l'allantoïnase dans de nombreux champignons. Compt. rend. Acad. sciences 1931, CXCII, S. 442.

Zu S. 706

A. Kissel, Chemie des Protoplasmas 1930 (Gebr. Borntraeger, Berlin).

---

[1]) K. Nordheim, Entwicklungscytologische und mikrochemische Untersuchungen an Conium maculatum, Diss. Berlin 1930 nach Bot. Zentralbl. 1930, N. F., XVII, S. 260.

[2]) A. Niethammer, Der mikrochemische Glykosidnachweis, Ztschr. wiss. Mikrosk. 1931, XLVII, S. 478 und Mikrochemie 1931, IX, S. 136.

Zu S. 709

S. Strugger, Beitrag zur Kolloidchemie des pflanzlichen Ruhekernes. Protoplasma 1930, X, S. 363.

Zu S. 722

Eugen Aubel, Über die Oxydations-Reduktionspotentiale lebender Zellen und ihre Bedeutung. Zeitschr. angew. Chem. 1930, XLIII, S. 939.

Zu S. 723

K. Kümmel, Elektrische Potentialdifferenzen an Pflanzen. Planta 1929, IX, S. 564.

Zu S. 727

K. Höfler, Über Eintritts- und Rückgangsgeschwindigkeit der Plasmolyse usw. Jahrbuch f. wiss. Bot. 1930, LXIII, S. 300. B. Huber und K. Höfler, Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas, ebenda S. 351.

Über Plasmolyse bei den Rotalgen s. K. Höfler. Zeitschr. f. Bot. 1930, XXIII, S. 570.

Zu S. 739

Zur vitalen Chromosomen-Färbung verwendet Gicklhorn[1]) mit Borsäure angesäuerte 0,05—1proz. Lösungen von Erythrosin und Eosin.

Zu S. 769

Bei Brassica entstehen die Plastiden mit Sicherheit aus den Mitochondrien. Der Entwicklungsgang ist in der Regel der folgende: Mitochondrium — Chondriokont — Hantelstadium — Zweispindelstadium — Plastiden (von Loui)[2]).

Zu S. 781.

Die Beeren von Hippophaë rhamnoides enthalten einen Zeaxanthin-Ester (Karrer u. Wehrli)[3]).

H. v. Euler, P. Karrer, E. v. Krauß und O. Walker, Zur Biochemie der Tomatenfarbstoffe, Helv. chim. Act. 1931, XIV, S. 154.

Zu S. 783

Karrer und Salomon[4]) isolierten ein Xanthophyll F. 176° aus den Blüten von Taraxacum officinale.

---

[1]) J. Gicklhorn, Zur Frage der Lebendbeobachtung und Vitalfärbung von Chromosomen pflanzlicher Zellen, Protoplasma 1930, X, S. 345.

[2]) J. von Loui, Fluoreszenzmikroskopische und zytologische Untersuchungen über die Frage der Individualität der Plastiden, Planta (Abt. E) 1930, XII, S. 191.

[3]) P. Karrer und H. Wehrli, Über den Farbstoff der Sandbeere (Hippophaë rhamnoides), Helv. chim. act. 1930, XIII, S. 1104.

[4]) P. Karrer und H. Salomon, Xanthophyll aus Löwenzahnblüten, Helv. chim. Acta 1930, XIII, S. 1063.

Zu S. 823

Stärke besteht aus zwei verschiedenen miteinander chemisch nicht verbundenen Komponenten: Amylopektin, dessen Grundstein das aus 6 Maltosemolekülen bestehende reduzierende Grenzdextrin I und Amylose, dessen Grundstein das Grenzdextrin II mit dem dreifachen Mol.-Gew. der Maltose (Polak und Tychowski)[1]).

Amylopektin und Amylose unterscheiden sich nur durch ihre Teilchengröße und verschiedene Beistoffe (v. Náray-Szabó)[2]).

Zu S. 884

A. Niethammer, Beiträge zur Identifizierung von Gespinst- und Papierfasern durch einfache mikrochemische Reaktionen, Faserforschung 1930, VIII, S. 121.

Zu S. 888

L. Velluz et J. Loiseleur, Sur les propriétés des membranes protéocellulosiques, Compt. rend. Acad. sciences 1931, CXCII, S. 306.

Zu S. 964

Fr. Zetzsche und H. Vicari, Untersuchungen über die Membran der Sporen und Pollen II. Lycopodium clavatum L. 2; dieselben, Untersuchungen usw. III. 3. Picea orientalis, Pinus silvestris L., Corylus Avellana L.; Fr. Zetzsche, H. Vicari und G. Schärer, Untersuchungen usw. IV. 3. Fossiles Sporopollenin aus dem Tasmanit und der Moskauer Braunkohle. Helv. chim. act. 1931, XIV, S. 67.

Zu S. 971

A. v. Wacek, Über Alkyl-Buchenholzlignine und ihre Spaltung, Ber. deutsch. chem. Ges. 1930, LXIII, S. 2984.

Zu S. 1013

Zur Methylenblaufärbung der Hefe s. H. Fink, Ztschr. physiol. Chem. 1931, CXCV, S. 215.

---

[1]) F. Polak und A. Tychowski, Beiträge zur Chemie der Stärke, vom diastatischen Standpunkt aus betrachtet, Biochem. Ztschr. 1930, CCXIV, S. 216.

[2]) St. v. Náray-Szabó, Über Stärkearten und die Konstitution der Stärke, Ztschr. physik. Chem. 1930, CLI, Abt. A, S. 420.

Register*)

*) Es ist in erster Linie auf die chemischen Stoffe und die Reagentien verwiesen. Namen von Pflanzen und Pflanzenfamilien sind nur genannt, wenn bestimmte mikrochemische Angaben vorliegen. Bei allgemein gebrauchten Reagentien (für Alkaloide, Glykoside, Lösungs- und Fixierflüssigkeiten, Farbstoffen) findet sich nur ein Hinweis auf Herstellung und Zusammensetzung. — N. = Nachweis, z. N. v. = zum Nachweis von, Zus. = Zusammensetzung des Reagens.

B

C

(s. a. K)

D.

G

M

N

Q

R

S

W

X

Y

Z